



Embryotoxicité de contaminants métalliques et organiques chez l'escargot *Helix aspersa*

Pierre-Emmanuel Baurand

► To cite this version:

Pierre-Emmanuel Baurand. Embryotoxicité de contaminants métalliques et organiques chez l'escargot *Helix aspersa*. Etudes de l'environnement. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : . tel-01223062

HAL Id: tel-01223062

<https://hal.science/tel-01223062>

Submitted on 1 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Franche-Comté
U.F.R SCIENCES ET TECHNIQUES
Laboratoire Chrono-Environnement (UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA)

ECOLE DOCTORALE « ENVIRONNEMENTS-SANTE »

Thèse en vue de l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

SPECIALITE : SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

**EMBRYOTOXICITE DE CONTAMINANTS METALLIQUES ET
ORGANIQUES CHEZ L'ESCARGOT *HELIX ASPERSA***

Présentée et soutenue publiquement par

Pierre-Emmanuel BAURAND

Le 26 septembre 2014

Membres du Jury :

Franck VANDENBULCKE (Professeur, Université Lille 1)

Rapporteur

Jérôme CACHOT (Professeur, Université de Bordeaux I)

Rapporteur

Alain GEFFARD (Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne)

Examineur

Annette DE VAUFLEURY (MCF HDR, Université de Franche-Comté, Besançon)

Directrice

Nicolas CAPELLI (MCF HDR, Université de Franche-Comté, Besançon)

Co-Directeur

Remerciements

Je tiens à remercier vivement Annette pour toutes les heures de travail effectuées afin de permettre le bon déroulement de ma thèse, depuis la rédaction des premières demandes de bourse de thèse et/ou de financement, en passant par les multiples relectures de présentations, comptes-rendus, articles et pour finir de ce manuscrit de thèse ! Merci également pour votre enthousiasme, vos conseils, votre disponibilité durant ces 3 années.

Merci à Nicolas, qui m'a permis de faire mes premiers pas en biologie moléculaire. C'est grâce à lui que je me suis découvert une vocation pour la « Biomol » ! Merci pour votre aide précieuse, votre disponibilité, vos conseils ainsi que pour les discussions que nous avons pu avoir durant ces dernières années.

Merci à Renaud, le 3^{ème} membre de l'encadrement, pour le temps consacré à ma thèse malgré son emploi du temps déjà bien chargé.

Un grand MERCI à tous les 3 pour votre confiance et votre implication respective dans mon encadrement. J'ai eu un réel plaisir à travailler avec vous durant ces années au laboratoire. Vous avez réussi à faire de moi un passionné de recherche. J'espère ne pas vous avoir déçu.

Je remercie les Professeurs Jérôme Cachot (Université de Bordeaux) et Franck Vandenbulcke (Université de Lille) pour avoir accepté d'évaluer mes travaux en tant que rapporteurs. Merci également à Alain Geffard (Université de Reims) pour son rôle d'examineur et membre du jury de thèse.

Je remercie également Alain Devaux, de l'ENTPE de Lyon, pour avoir accepté d'évaluer mon travail lors de mes 2 comités de thèse.

Une thèse, c'est 3 ans de dur labeur, mais c'est aussi beaucoup de rencontres. J'ai eu la chance, durant mes travaux, d'être accueilli dans différents laboratoires à Besançon comme ailleurs. C'est comme ça que j'ai pu faire la connaissance de nombreuses personnes qui m'ont aidé à un moment ou à un autre tout au long du parcours de la thèse. Je vais essayer d'être le plus exhaustif possible en n'oubliant personne. Je tiens donc à remercier :

Premièrement, les escargots qui m'ont fourni des pontes pendant 2 ans, et sans qui ce travail n'aurait pu être réalisable...

Le Professeur Reinhard Dallinger et les membres de son équipe : Veronika (Vroni) et Michael (Michi) pour l'accueil dans leur laboratoire à Innsbruck durant mes 2 séjours en terres autrichiennes. Grâce à eux, la qPCR et les MTs n'ont plus de secret pour moi et mes bases d'allemand se sont réveillées ! Je sais maintenant qu'extraire de l'ARN peut tourner au drame ! Ces 2 voyages dans la province du Tyrol resteront gravés dans ma mémoire tant ils ont été riches en bons moments (pinte de bière-pizza pour moins de 10€ et des cols pour faire du vélo, une sorte d'Eldorado pour moi !!!) mais aussi en moins bons (carte bleue avalée, chargeur d'ordinateur cramé, voiture en surchauffe, ça c'est ma guigne légendaire). Merci également à Benjamin Dietre pour la visite de la ville, pour le chargeur de secours...

Hélène Martin, du laboratoire de toxicologie cellulaire à Besançon pour son aide lors des tentatives infructueuses de mesure des caspases chez l'embryon. Merci également pour leur aide aux 2 autres membres de l'équipe : Alex et Lise.

Les membres du laboratoire de Biochimie de Besançon pour m'avoir formé au *Western blot* et à l'extraction de protéines. Merci spécialement à Régis, pour sa disponibilité et son aide ainsi qu'à Gilles et Annick pour les bons moments passés au p'tit RU.

Les membres du laboratoire de dermatologie de Besançon (LIBC) avec qui j'ai pu apprendre la culture cellulaire avant de commencer ma thèse. Ils m'ont toujours accueilli à bras ouverts lors de mes passages que ce soit pour utiliser leur matériel ou pour les saluer... Merci à Céline, Marion, Gwen, Hélène, Kévin, Hervé, Chanchan (et Maria, Pannetonman).

La thèse c'est aussi une ambiance, pendant 2 ans ½ place Leclerc puis à La Bouloie. Je tiens à remercier les nombreuses personnes avec qui j'ai pu partager de bons moments !

En premier, je dois remercier Coline ! En effet, sans ton travail de thèse sur le bioessai œuf, j'aurais sans doute passé un bon moment à me casser les dents sur de la mise au point ! Merci pour ta transmission de savoir sur les cagouilles, les pontes, les expos, les réponses à mes interrogations de jeune doctorant et ton aide pour « torcher les escargots ». Saches que ça a été un réel plaisir de bosser avec toi. Merci à Claire, ton ex-coloc pour ses conseils. Ça a commencé en M2 lorsque tu as fait preuve de patience pour parfaire ma formation biomol ! Finalement on s'est vite très bien entendu (hé oui Marc Lavoine et les macarons ça crée des liens) ! J'attends de tes nouvelles pour ma seconde thèse...

Merci à mon ex-coloc de bureau Eve qui m'a fait une place dans son bureau pendant plus de 3 ans et qui m'a proposé de participer au projet Petit Rhinolophe avant le début de la thèse!

Merci pour ces moments de déconne que je ne suis pas prêt d'oublier (Papayou, zoum zoum zen... C'est bientôt fini la fête à Neuneu ???, à l'aideeee j'ai mer** j'ai iiiinondé la place Leclerc...).

Merci à tous les collègues de place Leclerc avec qui j'ai pu échanger : Patrick, Mika, Francis, Geoffroy (le jeune thésard de la FREDON), Fred. Merci à mes techniciens préférés (Tata) Anne-Claude, Dom et JC qui n'ont jamais rechigné à venir donner un coup de jet aux escargots de l'animalerie. Merci aux secrétaires Brigitte et Marlène qui ont géré d'une main de maître mes commandes et aux stagiaires (Floriane, Sandra et Annelyse) que j'ai pu encadrer pour m'avoir permis de développer mon côté pédagogue.

Enfin, la thèse ce n'est pas qu'un hobby (à bon entendeur...), c'est aussi beaucoup de boulot, de stress (+++), d'émotions, de bons moments mais aussi des moins bons. J'ai commencé mon doctorat avec pour objectif de le réaliser en 3 années, j'ai enfin réussi à atteindre cet objectif et je n'en suis pas peu fier !

Finalement, quand on se retrouve en plein dans la thèse, on se rend vite compte que l'on peut y passer beaucoup de temps et très vite y laisser des plumes ! Et comme toute personne normalement constituée, j'ai eu des hauts et des bas ! Mais heureusement, j'avais toujours une solution (sport, copains, famille, etc...) pour penser à autre chose ! Le sport m'a donc été d'une grande utilité pour me vider la tête et/ou réfléchir à ma thèse pendant la pause déjeuner ou le soir après de dures journées de manip ou rédaction... J'ai réussi durant ma thèse à parcourir plus de km à vélo qu'en voiture. Après un rapide calcul : sur 3 ans, plus de 20 000 km en vélo de route et environ 4 500 km pour mes allers-retours domicile travail-Leclerc-Bouloie-Hauts du Chazal...(vélo = faible empreinte écologique ➔ limitation du trou dans la couche d'ozone). C'est aussi pas mal de course à pied l'hiver pour garder la forme, de la PPG (9 ans hé oui !! « 4 appuis pieds-mains, étirement moooollllets », Merci Pat), et du curling. Cette saison 2014 est selon moi le meilleur moment pour pendre le vélo au clou après 12 années d'entraînement intensif ! A moi la belle vie et le canap !! J'en profite également pour remercier les membres du bureau du Vélo Club Ornans et du comité d'organisation de l'Extrem/Loue, dont je fais partie. Merci à eux de m'avoir permis de passer des bons moments en pensant à autre chose qu'à ma thèse. Merci également à tous les coéquipiers du VCO avec qui j'ai pu mouiller le maillot durant tant de week-ends et tant d'années.

Il faut aussi que je remercie tous mes (~~amis~~) collègues doctorants avec qui j'ai pu parler de mes états d'âme et raconter des (~~bonnes~~) blagues. Merci à Séverine, Manon (Vieille

Branche), Anne (PriaL), Steffi (steffi-steffi-steffi Rooooocccchhhii), Jérem, Frère Béber, Totor (MC), Xéxelle, Zeinaba, Claire, La blousse, Pauline (Jeannette) et tous les autres... Et bien sûr, merci à mes 2 compères Nico et Fab ! Merci les cocos pour avoir été là durant les 5 dernières années, merci pour les crises de fou rire, les coups de main (pour les déménagements ! Hein Fab !!), les soirées... Grâce à vous, je savais qu'au moins 1 fois par jour j'allais pouvoir me détendre quelques minutes... Je pense qu'on aurait pu faire un recueil de toutes les âneries que l'on a faites ou dites durant ces années passées ensemble... Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite...

Merci à ma famille qui, sans vraiment comprendre exactement quel était le but exact de mes recherches, m'a toujours soutenu. Elle a toujours été là pour me faire passer des moments de détente, que se soit lors de la semaine annuelle de vacances familiales ou lors des WE de retrouvailles. J'ai la chance d'être membre d'une grande fratrie qui s'entend à merveille et qui a toujours été là pour moi depuis que je suis (gambelle) tout petit (~~et plus ou moins enrôlé~~). Merci donc à N°1 (cupide), N°2 (Dachau), N°3 (gros mollets) et N°5 (bambino) pour les moments partagés durant toutes ces années. Merci les fréro(e)s pour tout ce que vous avez fait pour moi. La gambelle vous salue bien bas !! Et une dédicace spéciale à Dachau pour les corrections « d'auretaugrafes ». Les années passent et la famille s'agrandit : merci à ma nièce Aline ainsi qu'à mes neveux Aubin (le tricet) et Renaud pour les bons moments partagés depuis leur arrivée. Merci également à mes belles-sœurs, Hélène et Sophie, ainsi qu'à mon beau-frère Benoît pour leur soutien !

Je ne peux écrire ces remerciements sans avoir une pensée pour mon cousin Christophe, d'un mois mon aîné, qui se bat avec un courage incroyable et sans relâche contre la maladie. Les quelques heures que je passe chaque semaine vers toi m'ont permis de prendre du recul sur ma vie de petit doctorant. Merci cousin pour ton oreille attentive et pour les discussions sur tout et n'importe quoi.

Mes remerciements suivants vont évidemment (c'est plus court) à mes parents, Agnès et Michel, qui n'ont pas hésité à faire des sacrifices durant des dizaines d'années pour élever leurs 5 enfants. Je vous en ai fait voir de toutes les couleurs mais vous avez toujours été là pour moi et je vous en remercie. Merci à vous 2 pour l'éducation que vous m'avez donnée et si j'en suis là aujourd'hui, c'est aussi (et surtout) grâce à vous. Je pense que vous pouvez être fiers de moi et surtout fier de vous... Merci Maman pour m'avoir écouté et soutenu lorsque ça

n'allait pas... Merci Papa (ou Mac Gyver) pour les coups de main à l'animalerie, les sorties vélos, les aides techniques en tout genre...

Merci à Leslie qui me supporte depuis bientôt 2 ans et qui m'a raisonné et motivé plus d'une fois. Je me suis vite rendu compte que c'est lorsqu'on est dans la même galère que l'on s'en sort le mieux. J'espère t'avoir apporté durant ces deux dernières années autant que tu m'as apporté. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, je m'arrêterai là, le reste je te l'ai déjà dit...

« Tout ce qui ne me tue pas me rend plus fort »

Friedrich Nietzsche

Sommaire

Avant propos	1
PARTIE I. Introduction Générale	3
I.1. L'évaluation du risque écotoxicologique	5
I.2. Embryotoxicité	7
I.2.1. Cadre législatif - contexte général.....	7
I.2.2. Chez les vertébrés	8
I.2.2.1. Les vertébrés aquatiques	8
I.2.2.2. Les vertébrés terrestres	10
I.2.3. Chez les invertébrés	10
I.2.3.1. Les invertébrés aquatiques	10
I.2.3.2. Les invertébrés terrestres	13
I.2.4. Résumé	15
I.3. Génotoxicité	17
I.3.1. Généralités.....	17
I.3.2. Méthodes d'analyse de la génotoxicité	18
I.3.2.1. Test des comètes	19
I.3.2.2. Test des micronoyaux	21
I.3.2.3. La méthode RAPD	23
I.4. Les Métallothionéines	30
I.4.1. Généralités.....	30
I.4.2. Rôles.....	31
I.4.3. Classifications	31
I.4.4. Les métallothionéines chez les Mollusques	31
I.4.4.1. Chez les gastéropodes pulmonés	33
I.4.4.2. Chez le petit-gris <i>Helix aspersa</i>	35
I.4.5. Les gènes des métallothionéines	36
I.4.5.1. Expression des gènes des métallothionéines chez <i>Helix aspersa</i>	36
I.4.6. Les métallothionéines chez les embryons	37
I.5. Modèle biologique étudié : l'escargot <i>Helix aspersa</i>	39
I.5.1. Biologie et écologie de l'escargot	39
I.5.2. Intérêts de l'utilisation de l'escargot en écotoxicologie	40
I.5.3. Reproduction et ponte	40
I.5.4. Développement embryonnaire	41
I.6. Contaminants étudiés	44
I.6.1. Cadmium	44
I.6.1.1. Effets toxiques.....	45
I.6.1.2. Effets généraux sur les organismes	45
I.6.1.3. Effets cancérigènes et mutagènes	46
I.6.1.4. Effets chez les embryons.....	47
I.6.2. Produits phytosanitaires	48
I.6.2.1. Le Round Up®	48
I.6.2.2. Le Corail®	48
I.6.2.3. La Bouillie Bordelaise.....	49
I.6.2.4. Effets toxiques de ces 3 pesticides chez les embryons	49

Bilan de l'introduction	51
OBJECTIFS DE LA THÈSE	52
I.7. Références bibliographiques	53
PARTIE II. Matériels et Méthodes	67
II.1. Conditions d'élevage des escargots en laboratoire et obtention des pontes	69
II.2. Systèmes et modalités d'expositions des oeufs	70
II.2.1. Dispositif d'exposition.....	70
II.2.2. Modalités d'exposition	71
II.2.2.1. Exposition continue.....	71
II.2.2.2. Exposition durant 24 heures	71
II.3. Prélèvements des œufs/embryons.....	72
II.3.1. Dosage des concentrations en cadmium dans les œufs.....	72
II.3.2. Suivi des paramètres de développement	72
II.3.3. Dissection des oeufs pour les analyses moléculaires.....	73
II.4. Etude de la génotoxicité des contaminants.....	73
II.4.1. Extraction d'ADN.....	73
II.4.1.1. Embryons jusqu'à 7 jours de développement.....	74
II.4.1.2. Embryons au-delà de 7 jours de développement.....	74
II.4.1.3. Analyse qualitative et quantitative de l'ADN.....	75
II.4.2. Analyse de la génotoxicité par RAPD	75
II.4.2.1. Sélection des amorces nucléotidiques.....	76
II.4.2.2. Analyse des profils	77
II.5. Etude de l'expression des gènes des métallothionéines	79
II.5.1. Extraction d'ARN	79
II.5.1.1. Digestion de l'ADN génomique.....	79
II.5.1.2. Quantification des ARN.....	80
II.5.2. Synthèse d'ADNc	80
II.5.2.1. Hybridation des amorces	80
II.5.2.2. Transcription.....	80
II.5.2.3. Synthèse.....	80
II.5.3. Mesures d'expression des gènes par PCR en temps réel	81
Synthèse du matériels et méthodes	83
II.6. Références bibliographiques	84
PARTIE III. Résultats.....	85
III.1. CHAPITRE 1 Mesure des effets embryotoxiques de contaminants métalliques chez l'embryon d'escargot terrestre <i>Helix aspersa</i>	87
III.1.1. An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk <i>Cantareus aspersus</i> : From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization.....	87
III.1.1.1. Introduction	88
III.1.1.2. Materials and methods.....	90
III.1.1.3. Results.....	93
III.1.1.4. Discussion.....	96
III.1.1.5. Acknowledgments.....	99
III.1.1.6. References.....	99
III.1.2. Résultats complémentaires	101

III.1.2.1. Utilisations des paramètres de mesure lors d'expositions continues à différentes concentrations de Cd et Cu.....	101
III.1.2.2. Accumulation du Cd dans les œufs exposés à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L	103
III.1.3. Résumé du chapitre 1	104
III.2. CHAPITRE 2 Embryogénotoxicité des contaminants chez l'escargot	105
III.2.1. Coupling of Random Amplified Polymorphic DNA Profiles Analysis and High Resolution Capillary Electrophoresis System for the Assessment of Chemical Genotoxicity.....	105
III.2.1.1. Introduction	107
III.2.1.2. Materials and Methods	109
III.2.1.3. Results.....	112
III.2.1.4. Discussion.....	117
III.2.1.5. Acknowledgments.....	121
III.2.1.6. References.....	122
III.2.2. Genotoxicity assessment of pesticides and Cd on terrestrial snail embryos with Random Amplified Polymorphic DNA.....	125
III.2.2.1. Introduction	126
III.2.2.2. Materials and Methods	127
III.2.2.3. Results.....	131
III.2.2.4. Discussion.....	136
III.2.2.5. Conclusion	139
III.2.2.6. Acknowledgements.....	139
III.2.2.7. References.....	140
III.2.3. Résumé du chapitre 2	142
III.3. CHAPITRE 3 Les systèmes de détoxification métal-spécifiques chez l'embryon d'escargot	143
III.3.1. Differential expression of metallothionein isoforms in snail embryos reflects early life stage adaptation to metal stress.....	143
III.3.1.1. Introduction	145
III.3.1.2. Materials and Methods	146
III.3.1.3. Results.....	150
III.3.1.4. Discussion.....	155
III.3.1.5. Conclusion	158
III.3.1.6. Acknowledgments.....	159
III.3.1.7. References.....	159
III.3.2. Differential sensitivity of snail's embryos to Cd: relation with age and MT genes expression.....	161
III.3.2.1. Introduction	162
III.3.2.2. Materials and Methods	163
III.3.2.3. Results and discussion	164
III.3.2.4. Conclusion	167
III.3.2.5. Acknowledgements.....	168
III.3.2.6. References.....	168
III.3.3. Metallothionein genes expression in embryos of terrestrial snails <i>Cantareus aspersus</i> exposed to cadmium and copper	169
III.3.3.1. Introduction	170
III.3.3.2. Materials and Methods	171
III.3.3.3. Results and discussion	172
III.3.3.4. Conclusion	174
III.3.3.5. Acknowledgements.....	175
III.3.3.6. References.....	175
III.3.4. Résumé du chapitre 3	176

PARTIE IV. Discussion Générale et Perspectives	177
IV.1. Discussion générale	179
IV.1.1. Effets des substances chimiques au niveau individuel : caractérisation de l'embryotoxicité	179
IV.1.2. Effets des substances chimiques au niveau génomique	182
IV.1.2.1. Fragmentation de l'ADN.....	182
IV.1.2.2. Détection du potentiel génotoxique des substances chimiques par RAPD	184
IV.1.2.3. Apports et limites de la RAPD-SHR lors de la mesure de la génotoxicité.....	185
IV.1.3. Effets de contaminants métalliques : expression des gènes des métallothionéines chez l'embryon	189
IV.1.3.1. Expression basale des gènes des métallothionéines.....	189
IV.1.3.2. Implications des gènes de métallothionéines dans la réponse au cadmium chez les embryons.....	191
IV.1.4. Facteurs modulant les réponses des embryons aux substances chimiques ...	193
IV.1.4.1. Stade de développement embryonnaire.....	193
IV.1.4.2. Régime d'exposition.....	194
IV.2. Conclusion & Perspectives	197
IV.3. Références bibliographiques	199
Valorisation scientifique.....	203
Liste des publications relatives à cette thèse acceptées ou soumises	203
Liste des autres publications.....	203
Liste des participations aux congrès internationaux, nationaux et inter-laboratoire .	203
Poster	204
Résumé de la thèse	205

Liste des figures

Figure I-1 : Ponte de limnée.....	12
Figure I-2 : Exemple de mesure des effets à différents niveaux d'organisation biologique	16
Figure I-3 : Différents types de lésions de l'ADN	18
Figure I-4 : Aperçu des résultats de la migration lors d'un test comète.....	20
Figure I-5 : Formation d'un micronoyau.....	21
Figure I-6 : Répartition des publications sur RAPD et génotoxicité depuis 2000.	24
Figure I-7 : Résumé des principales étapes de la méthode RAPD.....	27
Figure I-8 : Relation entre altérations de l'ADN et effet sur les profils RAPD	28
Figure I-9 : Structure primaire des métallothionéines.....	30
Figure I-10 : Arbre phylogénétique des métallothionéines chez les mollusques.	32
Figure I-11 : Arbre phylogénétique des métallothionéines chez les gastéropodes	34
Figure I-12 : Séquences primaires des 3 métallothionéines identifiées chez l'escargot adulte <i>Helix aspersa</i>	36
Figure I-13 : Expression des 3 gènes codant les isoformes de métallothionéines connues chez l'adulte <i>Helix aspersa</i>	37
Figure I-14 : Escargot sub-adulte <i>Helix aspersa</i>	39
Figure I-15 : Accouplement d' <i>Helix aspersa</i>	40
Figure I-16 : Structure de l'œuf d' <i>Helix aspersa</i>	41
Figure I-17 : Premiers stades embryonnaires chez <i>Helix pomatia</i>	42
Figure I-18 : Coupe histologique d'embryon d' <i>Helix pomatia</i>	42
Figure I-19 : Grandes étapes de l'embryogenèse d' <i>Helix aspersa</i>	43
Figure I-20 : Principales utilisations du cadmium	44
Figure I-21 : Effets du cadmium chez l'homme	46
Figure I-22 : Effets toxiques directs et indirects d'une exposition au cadmium.....	47
Figure II-1 : Salle et cages d'élevage des escargots en conditions contrôlées	69
Figure II-2 : Escargot <i>Helix aspersa</i> en cours de ponte et ponte avant nettoyage	70
Figure II-3: Dispositif d'exposition utilisant les œufs d' <i>Helix aspersa</i>	70
Figure II-4 : Scénario d'exposition de courte durée (24 heures).....	72
Figure II-5 : Exemple de résultats de la migration d'ADN sur gel d'agarose	75
Figure II-6 : Différents réactifs utilisés lors d'une réaction RAPD	76
Figure II-7 : Différences de migration entre 2 systèmes d'électrophorèse.	77

Figure II-8 : Données obtenues avec le Système d'électrophorèse Haute Résolution.....	78
Figure II-9 : Courbe standard pour le gène <i>CdMT</i>	82
Figure II-10 : Courbes standards utilisées pour le calcul du nombre de copies des gènes des 3 méthallothionéines à partir des valeurs de Ct.....	83
Figure III-1 : (a) Perimeter at 3 (3D) and 6 days (6D) of development for control (Ctrl) and Cd-exposed (6 mg/L) embryos. (b) Heart rate after 7 days of exposure.....	94
Figure III-2 : (a) Photographs of the 4 groups used for size classification	94
Figure III-3 : Cumulative hatching percentage from 15 to 19 days for control (Ctrl) and Cd- exposed (6 mg/L) snail eggs.....	95
Figure III-4 : (a) Fresh mass of newly hatched control (Ctrl) or Cd-exposed (6 mg/L) snails. (b) Genomic DNA pattern of control and exposed snail eggs based on 2% agarose gel electrophoresis.....	95
Figure III-5 : State of development of <i>Cantareus aspersus</i> embryos after 17 days of exposure to 6 mg/L Cd.	96
Figure III-6 : Battements cardiaques par minute chez des embryons de 7 jours exposés en continu à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd ainsi qu'à 0,5 g/L de Cu (Bouillie Bordelaise).	102
Figure III-7 : Poids frais des jeunes éclos (20 jours) en mg après une exposition continue à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd ainsi qu'à 0,5 g/L de Cu (Bouillie Bordelaise).	102
Figure III-8 : Concentrations en Cd d'œufs exposés de façon continue à des concentrations nominales de 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd.	104
Figure III-9 : Visualization of embryos: eggs with or without eggshell.	110
Figure III-10 : The genomic DNA pattern of snails' eggs exposed to Cd (0-24 h after fertilization) after a conventional agarose gel electrophoresis or a High Resolution System	113
Figure III-11 : Electrophoresis pattern of RAPD products obtained using the Essam-08 primer of DNA of unexposed <i>Helix aspersa</i> eggs.	114
Figure III-12 : Comparison of RAPD profiles and electropherograms obtained with the primer OPG17 (A and C) and with the primer X19 (B and D) used on DNA from 5 controls as a reference (A to E).	115
Figure III-13 : Gel image (A), electropherograms (B) and binary matrix (C) of RAPD profiles migration obtained with OPG17.	116
Figure III-14 : RAPD profiles migration obtained with primer X19.	117
Figure III-15 : Migration pictures and electropherograms obtained for 2 of the 6 primers used in RAPD amplifications on Cd-exposed embryos.	131
Figure III-16 : RAPD profiles obtained with OPG17 primer on Round Up [®] -exposed samples.	133

Figure III-17 : RAPD profiles migration obtained with Saad 02 primer on Corail®-exposed samples.	133
Figure III-18 : RAPD profiles migration obtained with X19 primer on Bordeaux Mixture-exposed samples.	134
Figure III-19 : Scheme of exposure and sampling conditions during embryonic development of control and Cd-exposed eggs of <i>Cantareus aspersus</i> applied to the present study.	148
Figure III-20 : 3% agarose gels with visualization of PCR amplicon bands specific for the three MT isoform genes (<i>CuMT</i> , <i>CdMT</i> and <i>CdCuMT</i>) of <i>Cantareus aspersus</i> embryos.	152
Figure III-21 : MT isoform mRNA transcription values for the <i>CdMT</i> , <i>CuMT</i> and <i>Cd/CuMT</i> genes of <i>Cantareus aspersus</i> in control eggs through embryonic development.	153
Figure III-22 : MT isoform mRNA transcription values of the <i>CdMT</i> , <i>CuMT</i> and <i>CdCuMT</i> genes in 6-day-old embryos of <i>Cantareus aspersus</i> exposed to Cd.	154
Figure III-23 : MT isoform mRNA transcription values of the <i>CdMT</i> , <i>CuMT</i> and <i>CdCuMT</i> genes in 12-day-old embryos of <i>Cantareus aspersus</i> exposed to Cd.	154
Figure III-24 : Comparisons of results obtained for the 2 stages of development studied in fonction of Cd real exposure concentrations.	166
Figure III-25 : Transcription of mRNA <i>MTs</i> genes in 20-days-old unexposed embryos (present data) and comparisons with transcription levels at 6, 7 and 12 days (adapted from Baurand et al. 2014b).	172
Figure III-26 : Transcription of mRNA MT genes in 20-days-old embryos Cd or Bordeaux Mixture-exposed.	174
Figure IV-1 : Œufs d' <i>Helix aspersa</i> sans coque calcaire. Observations entre 6 et 7 jours au stade larvaire sous loupe binoculaire et sous microscope.	181
Figure IV-2 : Détection de la fragmentation d'ADN chez les embryons d'escargots exposés 20 jours au fongicide Corail®	182
Figure IV-3 : Exemple d'amplifications parasites dans les témoins négatifs	187
Figure IV-4 : Exemple de profils contaminés	187
Figure IV-5 : Image de migration et électropherogramme des profils témoins amplifiés avec l'amorce Saad02.	188
Figure IV-6 : Expression du gène <i>CdCuMT</i> chez les adultes témoins d' <i>Helix aspersa</i>	190
Figure IV-7 : Comparaison des concentrations en Cd mesurées dans les œufs en exposition continue à 4 et 6 mg/L versus 5, 10, 15 mg/L sur 24 h aux jours 6 et 15.	195

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Exemple de facteurs d'extrapolation utilisés pour le calcul de la PNEC en milieu aquatique	6
Tableau I-2 : Articles scientifiques traitant de la RAPD en écotoxicologie	25
Tableau I-3 : Classification simplifiée des métallothionéines	31
Tableau II-1: Amorces testées lors des amplifications RAPD-PCR sur les embryons d' <i>Helix aspersa</i>	77
Tableau II-2 : Réactifs utilisés pour la synthèse ADNc	80
Tableau II-3 : Programme utilisé pour la synthèse d'ADNc.....	81
Tableau II-4 : Séquence et concentration optimale des amorces spécifiques des 3 gènes des métallothionéines utilisées en qPCR	81
Tableau II-5 : Programme d'amplification utilisé en qPCR	82
Tableau III-1 : Cadmium concentrations in eggs during development.	93
Tableau III-2 : Résumé des paramètres d'effets suivis lors d'expositions continues au Cd et à la Bouille Bordelaise.	103
Tableau III-3 : Sequences of primers used in the RAPD-PCR amplification of <i>Helix aspersa</i> embryos' genomic DNA.	114
Tableau III-4 : Summary of changes in RAPD profiles detected on pesticides-exposed embryos.	134
Tableau III-5 : Genomic template stability in Round Up [®] , Corail [®] and Bordeaux Mixture exposed samples.	136
Tableau III-6 : Cadmium concentrations in eggs of <i>Cantareus aspersus</i> recorded throughout the duration of the experiment	151
Tableau III-7 : Cadmium concentrations in eggs (µg/g dry weight) and transcription of MT genes (mRNA copy number/10 ng of total RNA) in <i>Cantareus aspersus</i> embryos exposed to Cd upon the 6 th day of development.	165
Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot <i>Helix aspersa</i>	183
Tableau IV-2 : Synthèse des résultats d'expressions des gènes des métallothionéines obtenus	192

Liste des abréviations et des sigles

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AFNOR : Association Française de Normalisation.

Al : Aluminium

AMPA : Acide aminométhylphosphonique

Ar : Argon

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

As : Arsenic

ASTM : ‘American Society for Testing and Materials’

B : Bore

BAP : Benzo(a)pyrène

BB : Bouillie Bordelaise

BPA : Bisphénol A

BSA : ‘Bovine Serum Albumine’

CdCuMT : Metallothioneine mixed Cd/Cu chez *Helix aspersa* (*Cantareus aspersus*)

CdMT : Métallothionéine spécifique du Cd chez *Helix aspersa* (*Cantareus aspersus*)

CuMT : Métallothionéine spécifique du Cu chez *Helix aspersa* (*Cantareus aspersus*)

Cd : Cadmium

Cd²⁺ : Ions cadmium

CEE : Communauté Economique Européenne

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer, IARC : ‘International Agency for Research on Cancer’

Co : Cobalt

Cr : Chrome

Cu : Cuivre

Cys : Cystéine

DEPC : Diéthyl pyrocarbonate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dNTPs : Désoxyribonucléosides triphosphates

EC : ‘Effective Concentration’ : concentration efficace

EE2 : 17 α -ethinylestradiol

ETM : Élément Trace Métallique
EU : Union Européenne
HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
Hg : Mercure
HpCdMT : Métallothionéine spécifique du Cd chez *Helix pomatia*
HpCuMT : Métallothionéine spécifique du Cu chez *Helix pomatia*
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
HSP : 'Heat shock protein'
HTO : Eau tritiée
ICP-AES : 'Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy'
ICP-MS : 'Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry'
ISO : Organisation internationale de normalisation
LOEC : 'Low Observed Effect Concentration' : plus faible concentration avec un effet observé
MDA : Malondialdéhyde
MF : Masse fraîche
Mg²⁺ : Ions magnésium
Mn : Manganèse
MTs : Métallothionéines
Ni : Nickel
NOEC : 'No observed effect concentration' : plus forte concentration testée sans effet observé
OECD : 'Organization for Economic Co-operation and Development'
Pb : Plomb
Pb²⁺ : Ions plomb
PCB : Polychlorobiphényles
PCR : 'Polymerase Chain Reaction'
PEC : 'Predicted Environmental Concentration' : concentration prévisible ou prédite dans l'environnement
PNEC : 'Predicted No Effect Concentration' : concentration prévisible sans effet pour l'environnement
POD : Peroxydase
POEA : Polyxyéthylène
ppm : partie par million
PVC : Polychlorure de vinyle

REACH : ‘Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals’ : Règlement européen sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques

ROS : ‘Reactive Oxygen Species’ : espèces réactives de l’oxygène

RT-PCR : ‘Reverse Transcriptase’ - PCR

RU[®] : Round Up[®]

Se : Sélénium

SHR : Système d’électrophorèse Haute Résolution

TBT : Tributyltin

TiO₂ : Dioxyde de titane

TPT : Triphenyltin

UVA et B : Rayonnement Ultraviolet A et B

WHO : ‘World Health Organization’ : Organisation mondiale de la santé

Zn : Zinc

Zn²⁺ : Ions zinc

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit concernent l'analyse des effets toxiques de contaminants métalliques et organiques chez l'embryon d'escargot terrestre *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus*). Ces recherches font suite aux travaux sur l'embryotoxicité de la thèse de Coline Druart (2007-2011). Le présent travail a pour but d'approfondir la connaissance des mécanismes impliqués dans les effets mesurés classiquement au niveau individuel (taux d'éclosion) par des investigations menées au niveau infra-individuel, (génomique et système de détoxification impliquant les métallothionéines).

Ce manuscrit représente l'aboutissement de 3 années de travaux effectués dans le cadre d'une allocation de recherche de l'Université de Franche-Comté. Le laboratoire d'accueil est l'UMR Chrono-Environnement de Besançon où la plupart des travaux de cette thèse ont été réalisés. Une partie des recherches a été effectuée à l'Institut de Zoologie d'Innsbruck en Autriche durant la seconde moitié de l'année 2013.

Le manuscrit comporte 4 parties :

1/ La première est une introduction générale relative d'une part à la mesure de la toxicité de substances chimiques (métaux, pesticides...) au niveau individuel et infra-individuel (génotoxicité) chez les embryons, et d'autre part aux systèmes de détoxification des métaux par les métallothionéines. Cette partie vise à identifier les lacunes et à définir les objectifs de ce travail de thèse.

2/ La seconde partie décrit les différentes méthodologies utilisées pour ce travail.

3/ La troisième partie présente les résultats obtenus dans 3 chapitres distincts :

- Le premier chapitre s'intéresse aux effets embryotoxiques du cadmium aux niveaux individuel et infra-individuel. Les résultats sont présentés sous forme d'une publication (rédigée en anglais) et de résultats complémentaires sur les effets d'un fongicide (Bouillie Bordelaise) (rédigés en français).

- Le deuxième chapitre décrit les résultats obtenus sur la détection d'effet génotoxique du cadmium et de pesticides sous forme de 2 publications (rédigées en anglais).

- Le troisième chapitre présente les résultats concernant l'identification et l'expression des métallothionéines chez les embryons. Il est composé de 3 projets de publications (rédigées en anglais).

4/ La quatrième partie discute les résultats obtenus et fait le bilan des nouvelles connaissances acquises sur l'embryotoxicité des contaminants étudiés dans ce travail. Elle expose également les perspectives ouvertes et à envisager pour de futures recherches.

PARTIE I. Introduction Générale

I.1. L'évaluation du risque écotoxicologique

L'écotoxicologie est une science se situant à l'interface entre écologie et toxicologie. Elle s'intéresse aux effets et aux devenir des polluants dans les écosystèmes. Un des grands objectifs de cette discipline est de prévoir les effets et les risques associés à la présence de substances chimiques dangereuses dans les écosystèmes. Classiquement, la démarche d'évaluation du risque environnemental d'une substance chimique à *priori* se compose de 3 grandes étapes (*Technical Guidance Document on Risk assesement*, EC 2003a,b ; Ramade, 2007)

1 / L'évaluation de l'exposition, qui a pour objet de déterminer les concentrations prévisibles dans l'environnement (PEC). Elle est généralement déterminée pour chacun des compartiments des écosystèmes : l'air, l'eau, le sol... Plusieurs facteurs sont pris en compte lors de la détermination d'une PEC comme le type de substances, les quantités émises, la nature des milieux récepteurs...

2 / L'évaluation des effets, qui va permettre de déterminer une concentration prévisible sans effet sur l'environnement (PNEC). Cette phase comprend deux parties :

- L'identification du danger qui correspond aux différents processus par lesquels on détermine si une substance est intrinsèquement dangereuse pour l'homme ou l'environnement.

- La détermination d'une relation dose-réponse entre les concentrations de la substance et les effets induits sur les individus de la population exposée. Pour ce faire, on utilise des bioessais (tests monospécifiques effectués la plupart du temps en laboratoire), qui permettent de caractériser la toxicité de la substance considérée chez des organismes de niveaux trophiques variés (bactéries, champignons, végétaux, animaux). Chez les animaux, les tests portent généralement sur la survie, le comportement, la croissance, la reproduction, le succès d'éclosion ou sur le développement embryonnaire.

Classiquement, les paramètres écotoxicologiques déterminés sont la **concentration sans effet observé** (NOEC), la **plus faible concentration ayant un effet** (LOEC), ou encore les **concentrations efficaces** induisant une inhibition de X % par rapport aux traitements témoins (CE_x). Suivant le type de bioessais réalisés (évaluation de la toxicité aiguë, ou chronique, en conditions contrôlées ou *in situ*), le nombre de modèles biologiques considérés ou encore le modèle d'étude utilisé, un facteur d'extrapolation variable est appliqué (Tableau I-1) aux données de toxicité pour estimer les concentrations sans effet. La valeur de PNEC est ainsi

calculée en divisant la plus faible NOEC obtenue à l'issue des bioessais par le facteur d'extrapolation sélectionné.

Tableau I-1 : Exemple de facteurs d'extrapolation utilisés pour le calcul de la PNEC en milieu aquatique (d'après Lemaire et Bakes, 2007)

Informations disponibles	Facteur d'extrapolation
Au moins une CE ₅₀ d'un essai court terme pour chacun des 3 niveaux standards (poisson, invertébré et algue)	1000
Une NOEC d'un essai long terme (daphnies ou poissons)	100
2 NOEC d'essais long terme pour 2 niveaux trophiques	50
3 NOEC d'essais long terme pour 3 niveaux trophiques	10
Données terrain ou de mésocosmes	Cas par cas

3 / L'évaluation du risque (rapport PEC/PNEC) qui correspond à la probabilité que la substance considérée soit présente dans l'environnement à une concentration toxique pour les organismes vivants. Pour les substances chimiques, si ce rapport est supérieur à 1, il existe alors un risque pour l'environnement (pour les pesticides, l'évaluation du risque diffère légèrement : un risque existe si le ratio toxicité/exposition est < 5).

L'approche expérimentale utilisée lors de l'évaluation du risque des produits chimiques, qui est souvent basée sur des bioessais de toxicité aiguë portant sur une seule phase du cycle de vie des organismes, reste critiquable. Elle ne rend pas compte notamment de la variabilité des réponses biologiques des individus dans l'espace et dans le temps (Ramade, 2007). Un individu au stade adulte n'a pas les mêmes réponses biologiques qu'un juvénile ou encore qu'un embryon en cours de développement. Il est donc important de disposer de bioessais d'écotoxicité renseignant sur les effets des substances chimiques à divers stades du cycle vital voir sur l'intégralité de ce cycle (Ducrot, 2013).

I.2. Embryotoxicité

I.2.1. Cadre législatif - contexte général

Le règlement européen REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) est entré en vigueur le 1^{er} Juin 2007. Il fait porter aux industriels la responsabilité d'évaluer et de gérer les risques posés par les produits chimiques. Ils doivent fournir aux utilisateurs les informations de sécurité adéquates (<http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach> ; EC 2006). REACH prône également le développement de méthodes alternatives limitant les essais sur animaux via la stratégie des 3 R (*Replace, Reduce and Refine*).

A cela s'ajoute la loi sur la protection des animaux à des fins expérimentales (directive européenne 2010/63/EU), entrée en vigueur le 1^{er} Février 2013, (en remplacement de la directive 86/609/CEE), qui s'applique aux organismes correspondant à la définition suivante : *tout vertébré vivant non humain, y compris les formes larvaires autonomes et les formes fœtales de mammifères à partir du dernier tiers de leur développement normal*.

C'est dans ce contexte législatif, que depuis les années 2000, de nombreux travaux de recherche en écotoxicologie se sont focalisés sur les stades précoces du développement de vertébrés et d'invertébrés pour évaluer l'embryotoxicité des substances chimiques. Les paramètres d'embryotoxicité (CEx) portent généralement sur la survie et le taux d'éclosion pour les œufs. De nombreuses études scientifiques s'intéressent à la recherche d'autres critères de mesures utilisables à différentes échelles d'organisations biologiques (individuelle, tissulaire, cellulaire, moléculaire) au cours du développement embryonnaire. Ceci afin d'obtenir une caractérisation des effets toxiques la plus complète possible, s'appuyant sur des paramètres complémentaires de ceux déterminés classiquement au niveau individuel (survie, éclosion...). Ces mesures réalisées au cours de l'embryogenèse permettent d'améliorer la compréhension globale des effets embryotoxiques des contaminants (cinétique d'apparition, détection d'effets précoces ou tardifs, paramètres physiologiques impactés...).

Il existe plusieurs avantages à l'utilisation d'œufs/embryons de vertébrés ou d'invertébrés lors de test de toxicité : chez les vertébrés, les œufs sont considérés comme des systèmes *in vitro* car se développant le plus souvent hors de la mère (Weisbrod et al., 2008). Actuellement, aucune loi ne considère les invertébrés à l'image de la directive 2010/63/EU qui ne les mentionne pas. Ils peuvent donc être considérés comme modèles *in vitro* au même titre que les œufs de vertébrés et ainsi représenter une méthode alternative aux expérimentations animales *in vivo*. Les tests d'embryotoxicité portant sur des organismes encore peu différenciés à des stades précoces du développement présentent également l'intérêt

d'être hautement sensibles comme en attestent les auteurs qui ont développé ce type de bioessais chez des espèces aquatiques (Gomot, 1998 ; Geffard et al., 2002 ; Schirling et al., 2006). Le succès d'éclosion qui, avec la fécondité (nombre œufs/individu), conditionne la fertilité (nombre éclos/individu) est un paramètre de grande importance. En effet, il reflète les performances reproductrices d'un individu, elles-mêmes en étroite relation avec la dynamique des populations (Forbes et Forbes, 1994).

Les paragraphes suivants décrivent des études existantes sur l'embryotoxicité chez certains vertébrés et invertébrés aquatiques et terrestres.

I.2.2. Chez les vertébrés

I.2.2.1. Les vertébrés aquatiques

L'objectif de cette partie est de réaliser un bilan des paramètres d'embryotoxicité mesurés à divers niveaux d'organisation biologique à travers le règne animal et non pas une revue bibliographique exhaustive de toutes les données disponibles chez l'intégralité des animaux. C'est pourquoi, les paragraphes suivants font une brève revue des données d'embryotoxicité existantes chez les amphibiens et les poissons dont les travaux de recherche ont permis d'aboutir à des méthodes standardisées modèles qui sont les plus utilisées à l'heure actuelle.

- Les amphibiens

Plusieurs bioessais d'embryotoxicité standardisés sont disponibles au niveau Français (AFNOR) et Américain (ATSM) sur chez les amphibiens dont le développement embryonnaire est l'un des mieux connus.

Un bioessai standardisé, nommé FETAX (*Frog Embryos Test Teratogenesis Assay Xenopus*) utilise les embryons du xénope *Xenopus laevis* et permet de mesurer les effets tératogènes des substances chimiques (Davies et Freeman, 1995 ; ASTM E1439-98, 1998). Il est basé sur plusieurs critères de mesure :

- morphologiques comme les malformations des organes majeurs (yeux, cerveau...),
- physiologiques comme le stade de développement, la mobilité embryonnaire,
- biochimiques avec des bio-marqueurs (enzymes, protéines) quantifiables au niveau cellulaire,
- moléculaires (étude sur ARN et ADN).

Plus récemment, Herkovits et Pérez-Coll (2003) ont développé un bioessai nommé AMPHITOX. Il comprend 4 tests utilisant des embryons d'amphibiens (*Bufo arenarum*) pour évaluer l'embryotoxicité de substances chimiques en se basant sur la survie ou les

malformations de développement. Ce bioessai a été standardisé en 2003 aux Etats-Unis (ASTM STP1443, 2003).

- Les poissons

En écotoxicologie, le poisson zèbre *Danio rerio* est fréquemment utilisé comme espèce modèle car son développement est parfaitement connu et son élevage maîtrisé. La majorité des travaux sur les embryons de poisson le concerne.

Les embryons de *D. rerio* ont notamment été utilisés pour déterminer la toxicité d'éléments traces métalliques (ETMs) (mercure (Me), cuivre (Cu), nickel (Ni), plomb (Pb) et cobalt (Co)) via la mesure des temps de survie et d'éclosion (Dave et Xiu, 1991). Des critères de développement ont été également pris en compte comme les malformations ou des retards de croissance pour mesurer l'embryotoxicité du cadmium (Cd) (Cheng et al., 2000 ; Hallare et al., 2005), du sélénium (Se) (Ma et al., 2012), de pétroles contenant des composés aromatiques polycycliques (HAPs) (Incardona et al., 2013), d'antibiotiques (Chang et al., 2014) ou encore de 27 substances chimiques (médicaments analgésiques ou antihistaminiques, vitamines, sédatifs, méthylmercure...) (Selderslaghs et al., 2012).

En plus de ces critères morphologiques, des paramètres physiologiques comme la fréquence cardiaque sont utilisés (Carlsson et Norrgren, 2004 ; Hallare et al., 2005, 2006 ; Beker van Woudenberg et al., 2013), tout comme la recherche de bio-marqueurs enzymatiques comme l'acétylcholinestérase, suite à l'exposition à des drogues (Teixidó et al., 2013), les glutathions S-transférases et lactates déshydrogénases après exposition au fongicide Prochloraz (Domingues et al., 2013), ou bien encore des protéines de choc thermiques (*Hsp70*) induites par des solvants (acétone, méthanol, DMSO ; Hallare et al., 2006). Une étude transcriptomique complète via des puces à ADN a été récemment réalisée sur des embryons exposés à la flusilazole (fongicide). Elle a permis d'identifier des bio-marqueurs d'effets précoces au niveau moléculaire (Hermsen et al., 2012).

Tous ces travaux ont abouti à la standardisation, au niveau international, de 2 tests d'embryotoxicité utilisant les stades embryonnaires du poisson zèbre (ISO 12890:1999 ; ISO 15088:2007). En 2013, l'OECD a adopté la ligne directrice 236 décrivant le *Fish Embryo Test* (FET, test poisson) qui utilise les œufs de *D. rerio* pour mesurer l'embryotoxicité de substances variées.

Les embryons d'un autre poisson, *Oryzias latipes* ou médaka, ont été utilisés pour tester la toxicité de HAPs, du diazon, du pentachloronitrobenzène (fongicide) (Hamm et Hinton, 2000 ; Cachot et al., 2007 ; Metcalfe et al., 2008 ; Fallahtafi et al., 2012 ; Mu et al., 2012) ou

d'effluents d'usine de pâte à papier (Orrego et al., 2011) via la mesure de malformations, des battements cardiaques, de la mortalité, du succès d'éclosion.

Plus rarement, d'autres espèces piscicoles ont été utilisées pour des mesures d'embryotoxicité : ainsi les effets du Cd ont été étudiés chez la dorade *Pagrus major* (Cao et al., 2009), ceux de composés organiques (pesticides, herbicides, insecticides, polychlorobiphényles (PCBs)) ont été analysés chez la carpe *Cyprinus carpio* (Velisek et al., 2012), le choquemort *Fundulus heteroclitus* (Rigaud et al., 2013), la truite *Oncorhynchus mykiss* et le killi *Jordanella floridae* (Orrego et al., 2011), ou encore le turbot *Psetta maxima* (Mhadhbi et Beiras, 2012).

I.2.2.2. Les vertébrés terrestres

Chez les vertébrés terrestres, les œufs d'oiseaux représentent un modèle très pertinent d'étude des effets des substances chimiques sur le développement des embryons (Ramade, 2000). Ils ont permis de montrer la toxicité de nombreux produits dans les années 1960 à 2000, ce qui a conduit à l'interdiction de pesticides comme par exemple le DDT, l'endosulfan (Carson, 1962 ; Hoffman et Eastin, 1981). Les œufs d'oiseaux sont facile d'usage à tous les stades de leur développement et les principaux stades de sensibilité des embryons ont été déterminés par des expériences classiques de tératogénèse (Wolff, 1936 ; Lutz et Lutz-Ostertag, 1973 ; de Vaufleury et al., 2013). En principe, seules les espèces dont l'élevage est possible peuvent être utilisées. Si les expérimentations sur œufs d'oiseaux domestiques (poules, cailles) ou sauvages (perdrix, faisans) sont assez aisées à réaliser, celles utilisant des œufs de reptiles, dont les populations sont en situation critique sont très réglementées. Ainsi, chez le lézard (*Sceloporus undulatus*) les effets néfastes du Cd sur les stades embryonnaires ont été démontrée par analyse de la mortalité, la taille des jeunes éclos ou des hormones thyroïdiennes (Brasfield et al., 2004).

I.2.3. Chez les invertébrés

I.2.3.1. Les invertébrés aquatiques

De nombreuses études menées chez les échinodermes, les mollusques bivalves et les gastéropodes ont permis de déterminer un grand nombre de paramètre de mesure des effets au niveau individuel, tissulaire, cellulaire ou moléculaire.

- Les échinodermes

Une des espèces classiquement utilisée en écotoxicologie aquatique est l'oursin (*Paracentrotus lividus*) dont on connaît très bien les stades de développement. Des effets

embryotoxiques ont été démontrés comme la mise en évidence de malformations après 48 heures d'exposition à 3 insecticides (Pentachlorophénol (PCP), Azinphos-méthyl (AZM), et Chlorpyrifos-éthyl) (Buono et al., 2012). Le Benzo(a)pyrène (BAP) provoque également des malformations, des arrêts de développements et une forte mortalité (Özlem et Hatice, 2008). Pinsino et al. (2010) ont mis en évidence une surexpression des protéines *Hsp70* et 60 par *Western blot* après exposition au manganèse. Toujours chez les embryons de *P. lividus*, Roccheri et al. (2004) ont remarqué une surexpression des *Hsp70* après exposition à des concentrations de Cd létales et sub-létales.

Chez d'autres espèces d'oursin comme *Lytechinus variegatus*, l'embryotoxicité de 4 composés organiques (TPT, TBT, irgarol et diuron) a été démontrée via la détection de l'arrêt du développement (Perina et al., 2011). Chez *Sphaerechinus granularis*, des effets tératogènes après exposition au Round Up® (RU®) ont été rapportés, de même qu'une inhibition de l'éclosion via la modification de la transcription d'une enzyme spécifique (Marc et al., 2005). Arslan et Parlak (2007) ont montré la toxicité du nonyl et de l'octylphénol sur les embryons d'oursin *Arbica lixula* (malformations, arrêts de développement, mortalité). Les travaux sur les embryons d'échinoderme ont permis de publier une méthode standardisée pour la mesure de la toxicité de substances (ASTM E1563-98, 2004).

- Les mollusques

De par leur capacité à accumuler les polluants, les mollusques sont très souvent utilisés comme organismes révélant la contamination des milieux (indicateurs d'exposition par analyse de la bioaccumulation ; de Vaufleury et al., 2013). Leur sensibilité à diverses contaminations environnementales permet également leur usage comme indicateurs d'effets. Le plus grand nombre de travaux porte sur les effets embryotoxiques chez les mollusques aquatiques marins ou d'eau douce (bivalves ou les gastéropodes).

- Les bivalves

Les embryons de moules (*Lampsilis siliquoidea*) ont été utilisés pour démontrer la toxicité (via la mesure de taux de survie) de différentes formulations de pesticides contenant du glyphosate (Bringolf et al., 2007). Des effets embryotoxiques de nanoparticules TiO₂ ont été également rapportés chez *Mytilus galloprovincialis* par des mesures de retards de développement et la description de malformations larvaires (Libralato et al., 2013).

L'huitre creuse *Crassostrea gigas* est aussi une des espèces de bivalve très utilisée en écotoxicologie marine. Les effets tératogènes de contaminants variés comme des métaux et des sédiments contenant des ETMs (Geffard et al., 2002, 2003 ; Mamindy-Pajany et al., 2013) ou encore de contaminants organiques comme le BAP, l'éthinylestradiol et l'endosulfan

(Wessel et al., 2007), des biocides comme l'igalol et le diuron (Mai et al., 2013), et des formulations de pesticides à base de glyphosate (Akcha et al., 2012 ; Mottier et al., 2013) ont été démontrés chez cette espèce. Les embryons de palourde (*Ruditapes decussatus*) ont été utilisés pour montrer les effets létaux de HAPs ou de métaux non-essentiels comme le Pb et le Cd (Fathallah et al., 2012, 2013). En France, les travaux sur les stades précoces du développement de l'huître creuse *C. gigas* et de 2 espèces de moules (*Mytilus edulis* ou *M. galloprovincialis*) ont abouti à la publication d'une norme (XP T90-382, 2009). Ces tests sont basés sur la mesure du pourcentage de larves anormales suite à une exposition de 24 heures à des contaminants.

- Les gastéropodes d'eau douce

Chez les gastéropodes, les données d'embryotoxicité concernent 3 familles de pulmonés d'eau douce : 1/ les lymnaeidae, 2/ les planorbidae et 3/ les ampullariidae.

1/ Les lymnaeidae sont très utilisées lors de tests d'embryotoxicité car leurs pontes ont la particularité d'être émises dans l'eau sous forme de masses gélatineuses transparentes contenant des œufs translucides. Le développement embryonnaire peut donc facilement être suivi sous loupe binoculaire ou microscope (Figure I-1).



Figure I-1 : Ponte de limnée
(Bandow et Weltje, 2012)

Lymnaea stagnalis a été largement utilisée pour montrer l'embryotoxicité de contaminants métalliques et organiques comme le Cd (Gomot, 1998), le nonyphénol (Lalah et al., 2006) et le tributyltin (Leung et al., 2007) via des mesures de croissance, délais de développement, mortalité ou éclosion. Récemment, Bandow et Weltje (2012) ont publié une proposition de bioessai d'embryotoxicité avec *L. stagnalis* donnant une réponse en 21 jours et utilisant des paramètres d'éclosion ainsi que le suivi des retards de développement. D'autres espèces de limnées sont également utilisées en embryotoxicité comme *L. palustris* chez qui des expositions au Cd engendrent des retards d'éclosion (Coeurdassier et al., 2003). Ce métal est également à l'origine de fortes mortalités et de malformations chez l'embryon de *Stagnicola elodes* (Pietrock et al., 2008). Une grande variété de critères de mesure (mortalité,

retard de développement, formation des yeux et du pied, battements cardiaques, durée des stades de développement, temps d'éclosion) ont été utilisés sur *L. luteola* pour analyser les effets embryotoxiques du Cu (Khangarot et Das, 2010 ; Das et Khangarot, 2011).

2/ Chez les planorbidæ, des tests embryotoxiques ont été réalisés sur *Biomphalaria glabrata* exposée à des composés organiques, nonyphénols, endosulfan (Oliveira-Filho et al., 2005), des molluscicides (Oliveira-Filho et al., 2010) ou encore des métaux (Cd, Pb, Ar) (Ansaldi et al., 2009) avec analyse de paramètres classiques de mortalité, d'anomalie du développement et de l'éclosion.

3/ Chez les ampullariidæ, Schirling et al. (2006) ont utilisé *Marisa cornuarietis* et les mêmes critères que ceux utilisés chez *L. luteola* pour mesurer la toxicité du Cd, du BPA et de l'EE2 (œstrogènes).

Parmi les gastéropodes prosobranches marins, l'ormeau (*Haliotis diversicolor supertexta*) a été utilisé pour déterminer les effets toxiques de 5 esters de phthalate (PAEs) via la mesure de malformations, du taux d'éclosion, d'arrêt de développement, de mesures biochimiques (POD, MDA) et l'étude de l'expression de 3 gènes bio-marqueurs d'effets de perturbation endocrinienne (Zhou et al., 2011).

I.2.3.2. Les invertébrés terrestres

Alors que de nombreux bioessais portent sur des invertébrés terrestres (annélides, crustacés isopodes, mollusques), les données d'embryotoxicité sont plus rares pour ces derniers. Elles concernent les mollusques : limaces et escargots dont les œufs ont une structure qui présente quelques analogies avec les œufs d'oiseaux mais dont l'incubation se déroule dans le sol, ce qui en fait un modèle très adapté pour l'évaluation écotoxicologique des contaminants de ce milieu. Par exemple, Iglesias et al. (2002) ont montré des effets toxiques d'herbicides, de fongicides et de molluscicides sur les embryons de limaces grises (*Deroceras reticulatum*) en mesurant les retards d'éclosion et le taux de mortalité. Shoaib et al. (2010) ont étudié l'embryotoxicité du nimbecidine (insecticide) chez l'escargot terrestre *Monacha obstructa* via l'analyse du succès d'éclosion.

Des travaux approfondis se rapportant à l'embryotoxicité des substances chimiques sur une espèce de gastéropodes terrestres ont été conduits au laboratoire Chrono-Environnement depuis 2010. Ces recherches se sont intéressées au développement d'un bioessai utilisant les œufs de l'escargot petit-gris, *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus*) (thèse de Coline Druart, 2011). Elles ont abouti à la publication de 3 méthodes d'exposition en phase liquide, solide ou gazeuse (Liquid, Solid, Gaseous Phase Bioassay : LPB, SPB, GPB ; Druart et al., 2010, 2012) qui permettent d'évaluer l'embryotoxicité de substances et de matrices

contaminées. L'utilisation du SPB a montré l'influence de certains paramètres du sol (comme le taux de matière organique) sur la toxicité de 2 pesticides alors que les premières données sur l'application du GPB n'ont pas permis de mettre en évidence une toxicité des contaminants volatils présents dans les sols étudiés (Druart et al., 2012). Le LPB, qui mime l'exposition des œufs aux contaminants de la solution du sol, est simple d'utilisation et permet d'obtenir une réponse rapide quant à la toxicité de contaminant après 15 à 20 jours d'exposition via analyse du taux d'éclosion. Ce bioessai en phase liquide a d'ailleurs permis d'évaluer la toxicité de 8 pesticides couramment utilisés lors du traitement de la vigne (Druart et al., 2010, 2012). Tous ces contaminants entraînent une réduction significative du taux d'éclosion et cela, à des concentrations inférieures à la dose recommandée lors des applications sur les zones à traiter.

L'embryotoxicité du Cd a également été évaluée via le LPB. Des effets embryotoxiques après 20 jours d'exposition à différentes concentrations (2, 4, 6, 8, 10 mg/L) ont été observés avec une EC50-Cd (basée sur le taux d'éclosion) de 3,9 mg/L. Chez les œufs/embryons exposés au Cd, l'embryogenèse a été bloquée à différents stades de développement suivant la concentration d'exposition. Des variations de réponse entre des individus exposés à la même concentration (4 mg/L) ont été rapportées avec des embryons bloqués de façon précoce durant leur développement (au stade gastrula) alors que d'autres l'étaient plus tardivement (au début de stade larvaire). Des concentrations de 6 mg/L engendrent des malformations dans la région céphalique et une absence de développement des yeux alors qu'à des concentrations plus fortes (8 et 10 mg/L) les embryons restent petits, malformés et n'éclosent jamais.

I.2.4. Résumé

Beaucoup de données d'embryotoxicité sont disponibles chez des organismes vertébrés et invertébrés aquatiques. Cette abondance de travaux résulte probablement de la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (2000/60/CE, 2004) qui exige d'atteindre un bon état écologique et chimique des cours d'eau d'ici 2015. Ce cadre réglementaire a encouragé le développement de méthodes biologiques de mesure des effets des contaminants présents dans les milieux aquatiques. Cependant, peu de données concernent le compartiment terrestre pour lequel le projet de directive-cadre relative aux sols de 2006 n'a toujours pas abouti (*Commission of European Communities*). Le sol est pourtant récepteur de nombreux contaminants qui proviennent par exemple de retombées atmosphériques (métaux, polluants organiques, éléments radioactifs), des activités agricoles (apport d'engrais, boues, pesticides) ou industrielles.

Le succès d'éclosion, l'apparition d'anomalies au cours du développement et la survie sont les variables les plus fréquemment mesurées lors des tests utilisant les stades embryonnaires. Les études sur les embryons de vertébrés et d'invertébrés aquatiques montrent qu'il existe au cours des stades de développement une grande variété de paramètres de mesure des effets sub-létaux. Mesurables à différents niveaux d'organisation biologique, ces paramètres peuvent être pris en compte lors d'études d'embryotoxicité (malformations, battements cardiaques, activités enzymatiques, expression de gènes).

La nature et les concentrations de contaminants retrouvées dans l'environnement étant très variées, disposer d'une large diversité de paramètres pour la mesure des effets toxiques s'avère intéressant afin d'en améliorer la détection en se basant sur des cibles potentielles aux différents niveaux d'organisation biologique. Ce type d'approche multi-niveaux permet également de mieux comprendre les mécanismes d'induction des effets toxiques, avec des mesures d'effets aux niveaux cellulaire et protéique (système de détoxification, biomarqueurs enzymatiques...) jusqu'à une approche globale au niveau individuel (mortalité, malformations, éclosion) (Figure I-2).

Le bioessai d'embryotoxicité en phase liquide (LPB) développé par Druart et al. (2010, 2012) sur les œufs de l'escargot d'*H. aspersa* a permis de mettre en évidence des effets embryotoxiques du Cd et de contaminants organiques en se basant sur le taux d'éclosion et l'observation de malformations embryonnaires en fin d'exposition. Cependant, ces observations ont été réalisées en fin d'exposition et aucune mesure sur la cinétique d'apparition des effets toxiques au cours du développement embryonnaire de l'escargot petit-gris n'a été réalisée. De plus, aucune donnée n'est disponible sur les mécanismes biologiques impliqués

dans la toxicité du Cd rapportée par Druart et al. (2010) à des niveaux sub-individuels (cellulaire, moléculaire).

Pour l'instant, peu de critères sont disponibles pour caractériser l'embryotoxicité aux différents niveaux d'organisation biologique chez *H. aspersa*. Il est donc nécessaire d'élargir la gamme de critères mesurables du niveau individuel au niveau moléculaire en vue d'améliorer :

- 1/ l'évaluation de l'embryotoxicité des substances chimiques *via* le LPB

- 2/ nos connaissances fondamentales sur les mécanismes d'action des contaminants au niveau individuel (paramètres du développement impactés : taille, retard...) comme au niveau moléculaire (détection d'effets génotoxiques) chez les embryons de cette espèce d'escargot

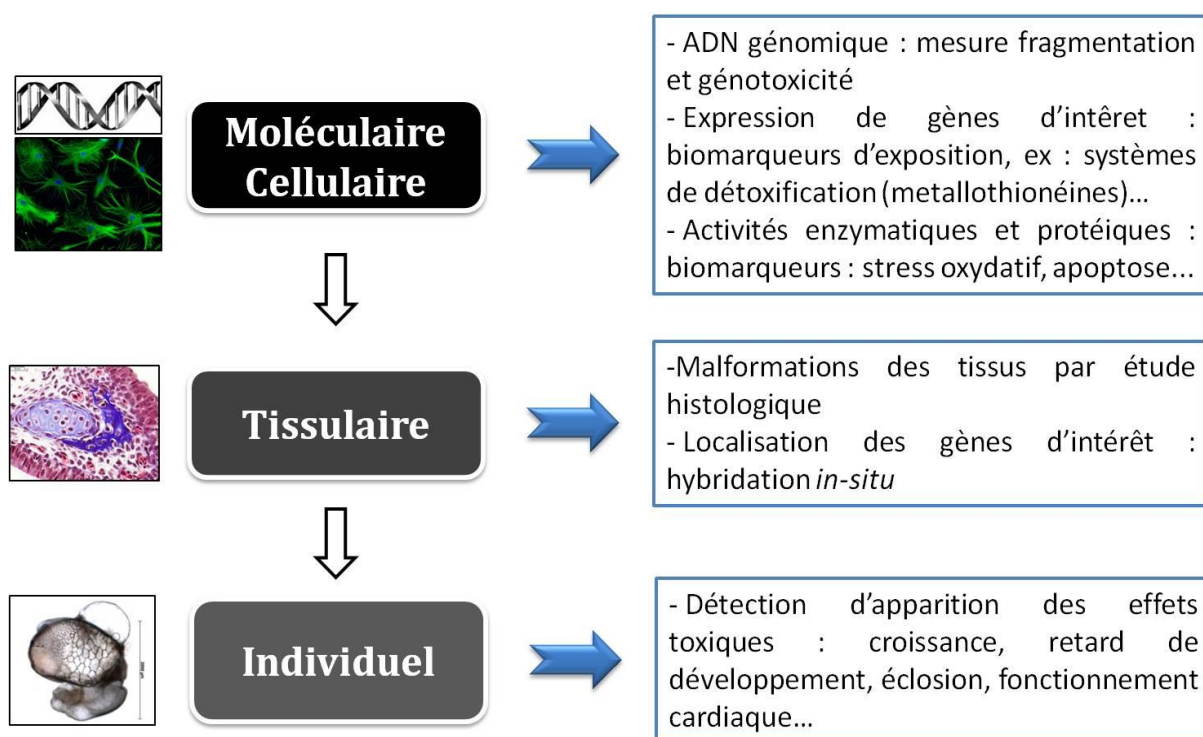


Figure I-2 : Exemple de mesure des effets à différents niveaux d'organisation biologique
(d'après Garric et al. 2010)

I.3. Génotoxicité

I.3.1. Généralités

Certains effets toxiques peuvent être décelés et mesurés à des niveaux d'organisation très fins sur l'ADN génomique par la détection de signes génotoxiques (Figure I-2).

La génotoxicité est définie comme la capacité de certains agents chimiques, physiques ou biologiques à provoquer des dommages à l'ADN qui peuvent conduire à des mutations génétiques. Ces agents mutagènes (Dégremont et Cachot, 2009), sont de deux types :

- les génotoxiques directs, capables de modifier la structure de l'ADN (ex : cassures simple et double brin). On parle dans ce cas d'effet clastogène.
- les génotoxiques indirects qui nécessitent une activation métabolique préalable avant d'exercer leurs effets sur le matériel génétique. Lorsqu'un agent provoque des anomalies au niveau du nombre de chromosomes (aneuploïdie). Dans ce cas, on parle d'effet aneugène.

Il existe un grand nombre de dommages possibles à l'ADN (Figure I-3). Lorsque les substances induisent des modifications de la séquence nucléotidique ou des cassures, on parle de lésions primaires (ou structurales) comme :

- les adduits qui correspondent à la liaison entre une molécule et une base de l'ADN (Jeffrey et Williams, 2005). Ce type de lésion modifie la structure spatiale de l'ADN, perturbant ainsi sa reconnaissance par l'ADN polymérase au cours de la réplication ou de la duplication.
- les cassures (simples et doubles brins) sont des lésions correspondant à la rupture d'un ou des deux brins de la molécule d'ADN. Les cassures doubles peuvent avoir lieu à la même position ou bien à des positions très proches. Ces lésions peuvent être induites par de nombreux facteurs (espèces réactives de l'oxygène (ROS), par exemple) ou par des radiations ionisantes comme les rayons X ou gamma. Les cassures doubles brins sont considérées comme des dommages particulièrement délétères car difficilement réparables. Moins fréquemment, des pontages intra ou inter-brins apparaissent, correspondant à des liaisons covalentes anormales entre des bases de l'ADN et des cassures simples ou doubles brins (Dégremont et Cachot, 2009).

Des additions, des substitutions ou des délétions de bases peuvent avoir lieu au sein de la double hélice d'ADN avec des répercussions potentielles sur les protéines issues de l'expression des gènes concernés par ces mutations. Enfin, des lésions oxydatives du matériel génétique peuvent être générées lors de l'attaque des bases de l'ADN (généralement la guanine) par des ROS.

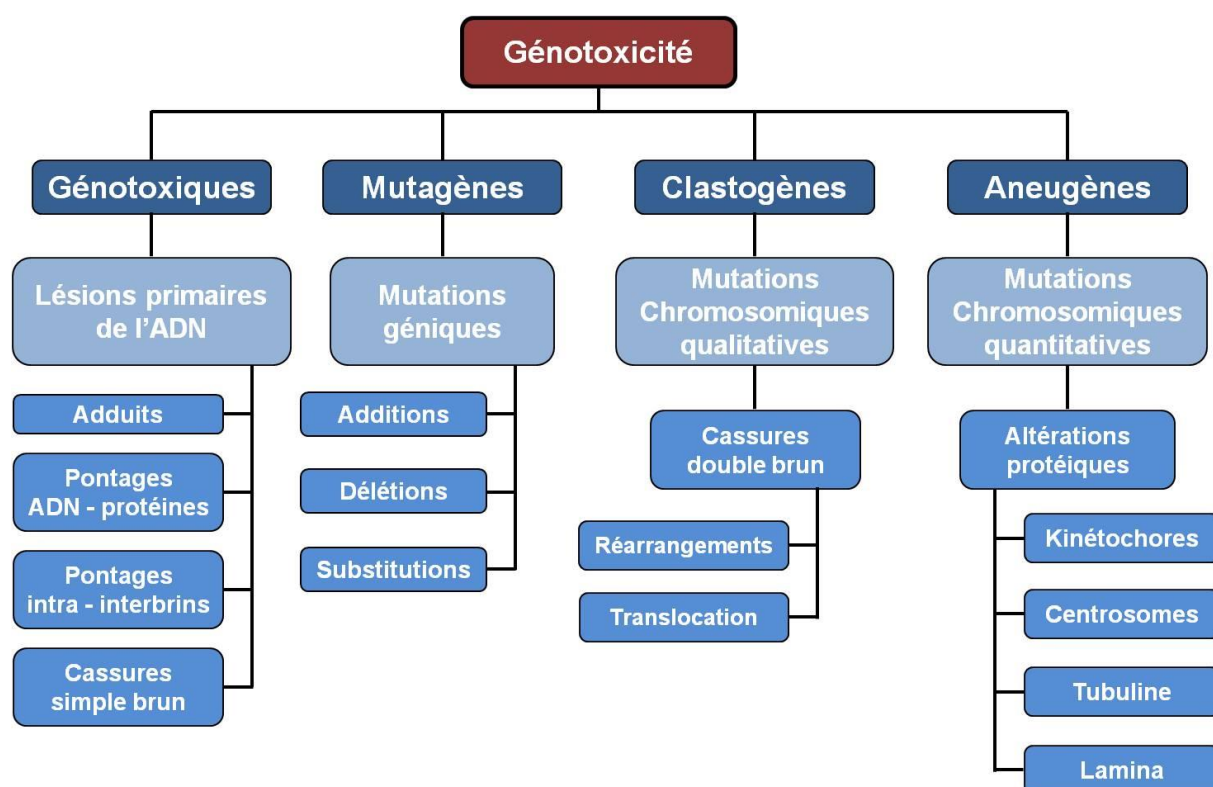


Figure I-3 : Différents types de lésions de l'ADN
(d'après Orsière et al. 2005)

En principe, les dommages subis par l'ADN peuvent affecter tous les niveaux d'organisation biologique, et à terme avoir des répercussions sur la dynamique des populations (Vasseur et al., 2008). Cependant, les cellules possèdent plusieurs mécanismes spécifiques permettant de contrôler l'intégrité du patrimoine génétique puis le cas échéant de le réparer. Il existe deux types de systèmes de réparation : les mécanismes conservatifs d'excision re-synthèse qui garantissent une réparation fidèle, et les systèmes dits fautifs qui interviennent dans un second temps lorsque les mécanismes conservatifs sont dépassés par l'abondance des lésions de l'ADN. Ces systèmes fautifs permettent une réparation d'urgence qui autorise alors la reprise de la réplication de l'ADN mais ne garantissent pas le maintien de l'intégrité de cet ADN (Dégremonet et Cachot, 2009).

I.3.2. Méthodes d'analyse de la génotoxicité en écotoxicologie

En écotoxicologie, 2 méthodes de mesure/détection des signes de génotoxicité sont couramment utilisées, chacune d'elles présentant des avantages et des inconvénients. Les paragraphes suivants décrivent succinctement ces 2 méthodes : l'essai comète et le test des micronoyaux. Enfin, une 3^{ème} méthode utilisée depuis une quinzaine d'années en écotoxicologie, la PCR par amorçage aléatoire ou *Random Amplified Polymorphic DNA*

(RAPD), sera présentée en précisant son intérêt potentiel pour l'étude de la génotoxicité des contaminants sur le modèle œufs/embryons d'escargot.

I.3.2.1. Test des comètes

Le test des comètes ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) a été mis au point en 1984 par Ostling et Johanson. Il a permis de détecter les cassures doubles brins chez des cellules isolées de mammifères. En 1988, Singh et al. ont adapté la méthode pour permettre la détection des cassures doubles et simples brins sur des lymphocytes humains. Le nom de ce test vient de la visualisation des noyaux endommagés qui prennent l'aspect de comètes classiquement observées en astronomie avec une tête et une queue (Figure I-4).

- Principe de la méthode

Le test des comètes est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose. Il permet la détection spécifique de cassures simples et doubles brins ou la mise en évidence d'une fragmentation de l'ADN synonyme d'apoptose (mort cellulaire programmée). Ce test est effectué sur un même type cellulaire et requiert parfois une étape de dissociation. En écotoxicologie, il a été couramment utilisé sur de nombreux groupes d'organismes : plantes, planaires, oligochètes, mollusques gastéropodes et bivalves, crustacés, insectes, échinodermes, poissons, amphibiens et mammifères (Jha, 2008).

La méthodologie de ce test est la suivante : les cellules isolées sont emprisonnées dans un gel d'agarose puis lysées (souvent en milieu alcalin). L'ADN dénaturé est séparé par électrophorèse puis coloré au bromure d'éthidium. Les noyaux dont l'ADN a subi des cassures vont présenter une forme de comète tandis que les noyaux dont l'ADN n'est pas lésé apparaissent sous forme d'un cercle (Figure I-4). Une évaluation semi-quantitative (classement en quatre catégories) ou quantitative (évaluation du *Tail-moment*) des taux de dommages est ensuite réalisée.

L'analyse des résultats s'effectue la plupart du temps de manière quantitative à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Généralement, les données sont exprimées en pourcentage du nombre de cellules ayant subies des dommages (ou pourcentage de comètes) dans la population cellulaire étudiée (Cotelle et Férard, 1999).

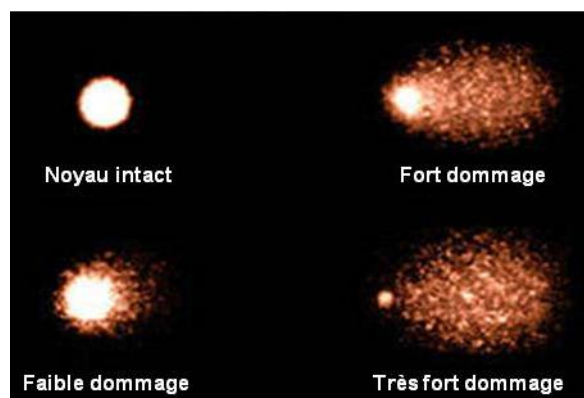


Figure I-4 : Aperçu des résultats de la migration lors d'un test comète
(modifiée d'après <http://www.entpe.fr>)

- Avantages et inconvénients de la méthode

Les principaux avantages du test comète sont les suivants : il nécessite peu de matériel et il est applicable à de nombreux organismes. La méthodologie est simple, rapide et peu coûteuse. Ce test très sensible permet une détection spécifique des cassures doubles et simples brins ainsi que des sites alcali-labiles. Il est généralement utilisé sur des cellules circulantes ne nécessitant pas de dissociation préalable : érythrocytes de poissons (Galindo et al., 2010), cellules sanguines de branchies chez *D. rerio* (Rocco et al., 2010), cœlomocytes (cellules immunitaires) de vers de terre (Fourie et al., 2007), hémolymphe d'escargots terrestres (Leffa et al., 2010 ; Itziou et al., 2011a,b).

Il existe une réelle hétérogénéité dans les protocoles utilisés (temps de migration, fixation, neutralisation) qui peuvent avoir une incidence sur le résultat des tests. De même, on trouve une forte hétérogénéité dans l'expression des résultats, ce qui rend difficile les comparaisons entre les travaux publiés (Belpaeme et al., 1998 ; Schnurstein et Braunbeck, 2001). Le débit de lecture des lames est relativement faible : 600 comètes peuvent être lues individuellement par jour et 50 lames/jour de façon automatique. Cette méthode n'apporte pas d'information sur la taille des fragments d'ADN analysés (Olive et Banáth, 2006). Enfin, ce test présente deux inconvénients majeurs :

- les traitements enzymatiques ou mécaniques nécessaires à la dissociation cellulaire peuvent provoquer des dommages du matériel génétique biaisant alors les résultats du test.
- l'absence de protocole standard pour la dissociation des tissus et la lyse des cellules (Jha, 2008).

- Application du test comète pour l'évaluation de la génotoxicité chez l'embryon

Il existe peu de travaux sur l'étude de la génotoxicité de substances chez l'embryon par SCGE. Néanmoins, certaines équipes de recherche ont publié récemment des résultats sur des cellules embryonnaires d'organismes aquatiques. Chez l'embryon d'huitre (*Crassostrea gigas*) exposé au BAP, au 17-ethinylestradiole, et à l'endosulfan (Wessel et al., 2007) et au métolachlore et à l'irgarol (pesticides), au Cd, au Cu (Mai et al., 2012) des signes de génotoxicité ont été montrés tout comme chez l'embryon de poisson (*Oryzias latipes*) exposé au Cd et au Cu (Barjhoux et al., 2012). Les larves de poisson medaka ont également été utilisées pour montrer la génotoxicité du Cd, du peroxyde d'hydrogène et du fluoranthène (Morin et al., 2011). La génotoxicité du platine a été démontrée chez des embryons de gastéropode aquatique (*Marisa cornuarietis*) par SCGE (Osterauer et al., 2011).

La méthodologie utilisée par Wessel et al. (2007) illustre bien les difficultés qui peuvent être rencontrées pour dissocier les cellules embryonnaires. La réussite de cette étape peut constituer un frein à l'utilisation du test comète sur les formes embryonnaires.

I.3.2.2. Test des micronoyaux

Ce test *in vitro* a été développé à partir des années 1970 sur un grand nombre d'organismes aquatiques (Godet et al., 1993). Il est basé sur la détection de micronoyaux dans le cytoplasme de cellules en division. Les micronoyaux résultent de la perte de tout ou d'une partie d'un chromosome durant la télophase formant un petit noyau supplémentaire séparé du noyau principal de la cellule. Ils peuvent provenir de la non-séparation des chromatides ou encore de cassures de chromosome (Figure I-5). Le test des micronoyaux (MN) permet de détecter les effets génotoxiques aneugènes ou clastogènes d'une substance (bio-marqueur d'effet).

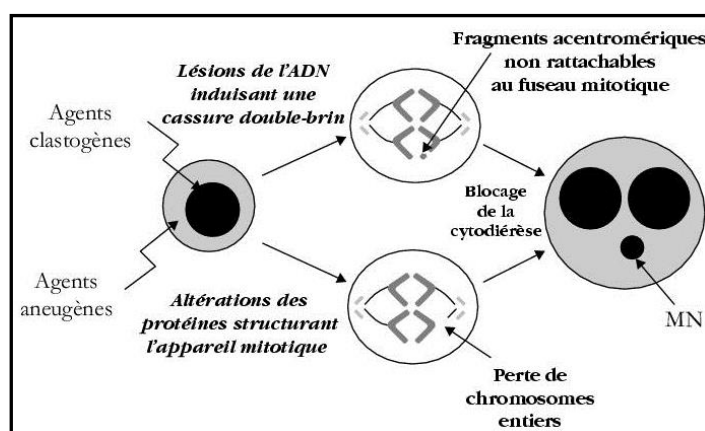


Figure I-5 : Formation d'un micronoyau (d'après Iarmarcovai et al. 2007)

- Principe de la méthode

La méthode repose sur la coloration cellulaire. Les colorations (orcéine généralement) sont observées sous microscope et un dénombrement des micronoyaux est effectué. Ce test est largement utilisé en écotoxicologie. De nombreux protocoles sont disponibles notamment sur des érythrocytes de mammifères (OECD, 1997, 2010) ou d'amphibiens (Rocha, 2011).

- Avantages et inconvénients

Cette méthode présente un coût modéré, elle est rapide et l'interprétation des résultats est simple (comptage de 1000 cellules). Ce test peut être effectué sur des cellules *in vitro* et *in vivo* chez de nombreux organismes. Tout comme le test comète, il est généralement mis en oeuvre sur des cellules circulantes ce qui permet de s'affranchir de l'étape délicate de dissociation. Il a été utilisé sur des érythrocytes chez le poisson *Prochilodus lineatus* (Galindo et al., 2010) et chez des cellules de branchies de moule *Mytilus edulis* (Izquierdo et al., 2003). Le MN a été utilisé avec succès sur des cellules d'hémolymphe et de branchies de la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) pour déterminer la génotoxicité du Cd, du BAP (Vincent-Hubert et al., 2011). L'application du MN sur des contaminants émergents (nanoparticules) a également révélé l'intérêt de cette méthode pour étudier la génotoxicité potentielle d'une large gamme de substances (Kirsch-Volders et al., 2011).

Un des inconvénients de cette méthode est que les micronoyaux ne peuvent être observés qu'après une mitose. Cela nécessite de connaître la durée d'un cycle pour la population cellulaire étudiée. De plus, certains tissus possédant un taux de division faible peuvent être inadaptés au MN. Tout comme le test comète, le MN requiert l'obtention de cellules dissociées avec, en plus, des cytoplasmes intacts. Selon Sánchez-Argüello et al. (2012), les protocoles de dissociation cellulaires sur embryons varient d'un organisme à un autre et les traitements sont parfois très compliqués à mettre en œuvre (dissection, dissociation mécanique puis chimique...).

- Application du test des micronoyaux pour l'évaluation de la génotoxicité chez l'embryon

Peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'utilisation de cette méthode chez l'embryon. Un protocole pour l'utilisation du MN a été développé par Saotome et al. (1999) chez des embryons d'oursin (*Hemicentrotus pulcherrimus* et *Clypeaster japonicus*). Récemment, Sánchez-Argüello et al. (2012) ont utilisé le MN avec succès sur des cellules d'embryons dissociées de gastéropodes aquatiques (*Physa acuta*) exposés à divers contaminants : BAP, fluoxétine, vinclozoline.

Un faible nombre d'études utilisent ces 2 méthodes pour caractériser la génotoxicité sur des modèles embryonnaires. Cela est probablement dû à la complexité de l'étape de dissociation cellulaire (cf méthodologie de Sanchez-Argüello et al. (2012)) pour le test comète et à la nécessité d'obtenir des cellules en division pour le test des micronoyaux. De plus, ces deux méthodes sont spécifiques de certains dommages à l'ADN et ne sont applicables que sur un seul type de cellule. Afin de limiter les inconvénients des 2 méthodes décrites ci-dessus et puisqu'aucune donnée n'est actuellement disponible sur le potentiel génotoxique de substances chimiques chez l'embryon d'escargot, nos recherches se sont donc focalisés sur une autre méthode qui permet la détection d'un large éventail de mutation dans l'ensemble du génome de l'organisme étudié : la PCR par amorçage aléatoire ou *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

I.3.2.3. La méthode RAPD

- Place dans la littérature scientifique

Initialement, cette méthode était utilisée lors d'études de taxonomie et de phylogénie basées sur la détection du polymorphisme entre espèces (Atienzar et Jha, 2006). Depuis une quinzaine d'années, elle est souvent utilisée en écotoxicologie comme en témoigne le grand nombre de travaux publiés (59) depuis 2000 (Figure I-6). L'utilisation du mot clé "RAPD" pour une recherche bibliographique permet de dénombrer 667 articles pour l'année 2013 dont 15 traitent de génotoxicité (environ 2%) en écotoxicologie (articles d'études *in vitro* sur modèles humain, rat/souris exclus), le reste concernant principalement des études de taxonomie/phylogénie.

Parmi les 59 articles recensés avec les mots clés « RAPD » et « Génotoxicité », environ 40% concernent des modèles d'études animaux et 60% des modèles végétaux avec une parité entre les organismes aquatiques et terrestres (Figure I-6). Cette méthode est utilisée chez de nombreux organismes : plantes cultivées (Liu et al., 2009 ; Ahmad et al., 2012 ; Erturk et al., 2013), algues (Atienzar et al., 2000 ; Tuney et al., 2007), protozoaires ciliés (Zhou et al., 2011), poissons (Cambier et al., 2010 ; Rocco et al., 2010 ; Nan et al., 2013), mollusques aquatiques (Hagger et al., 2005 ; Barky et al., 2012), pour tester la génotoxicité de contaminants variés. 42% des articles s'intéressent aux métaux (Enan, 2006 ; Liu et al., 2009 ; Aydin et al., 2013), 30% à des polluants organiques (Atienzar et al., 2002a ; Atienzar et Jha, 2004 ; Mohanty et al., 2009 ; Barky et al., 2012), 10% à des contaminants biologiques comme

des mycotoxines (Becerril et al., 1999 ; Mahrous et al., 2006), des moisissures (El-Maarouf-Bouteau et al., 2011) ou encore des microalgues toxiques (Mat et al., 2013). Les autres contaminants étudiés sont pour l'essentiel des radionucléides (Theodorakis et al., 2001 ; Hagger et al., 2005 ; Ozakca et Silah, 2013), des nanoparticules (Geffroy et al., 2012 ; Lee et al., 2013) ou encore des contaminants physiques type rayons gamma (Dhakshanamoorthy et al., 2011) ou UV A et B (Atienzar et al., 2000). Le Tableau I-2 résume les différents travaux de génotoxicité via RAPD disponibles dans la littérature.

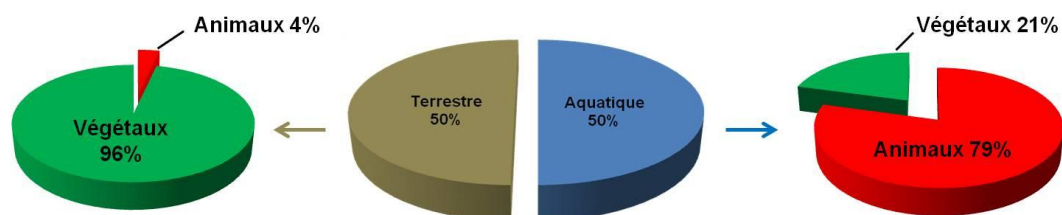


Figure I-6 : Répartition des publications sur RAPD et génotoxicité depuis 2000.

Tableau I-2 : Articles scientifiques traitant de la RAPD en écotoxicologie présentés par ordre alphabétique des auteurs

Auteur	Année	Animaux Végétaux	Aquatique Terrestre	Modèle d'étude	Types de contaminants	Substance(s)
Ahmad et al.	2012	végétaux	Terrestre	Riz (<i>Oryza sativa</i>)	métaux	Ar
Aksakal	2013	végétaux	Terrestre	Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	organique	Paraquat
Aksakal et al.	2013	végétaux	Terrestre	Maïs (<i>Zea mays</i> L. cv. TC-513)	organique	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
Al-Quraïny et al.	2010	végétaux	Terrestre	Salade Roquette (<i>Eruca sativa</i>)	métaux	Zn, Pb et Cd
Aras et al.	2011	végétaux	Terrestre	Lichens (<i>Pseudevernia furfuracea</i> L.)	mixte	Polluants atmosphériques
Atienzar et al.	2000	végétaux	Aquatique	Algue rouge (<i>Palmaria palmata</i>)	physique	UV-A et B
Atienzar et al.	2001	animaux	Aquatique	Daphnies (<i>Daphnia magna</i>)	métaux	Cu
Atienzar et al.	2002			<i>E. coli</i> , <i>thymus de veau</i> , algue rouge (<i>Palmaria palmata</i>)	physique et organique	B[a]P, sonification et BPDE
Atienzar et al.	2002	animaux	Aquatique	Balanés (<i>Elminius modestus</i>)	organique	4-n-Nonylphenol et 17-β estradiol
Atienzar et Jha	2004	animaux	Aquatique	Daphnies (<i>Daphnia magna</i>)	organique	B(a)P
Aydin et al.	2012	végétaux	Terrestre	Comcombre (<i>Cucumis sativus</i> L.)	métaux	Cu et Zn
Aydin et al.	2013	végétaux	Terrestre	Plante okra (<i>Abelmoschus esculantus</i> L.)	métaux	Cd
Barky et al.	2012	animaux	Aquatique	Escargots aquatiques (<i>Biomphalaria alexandrina</i>)	organique	Atrazine and Roundup
Becerril et al.	1999	animaux	Aquatique	Cellules gonades truites (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	biologique	Micotoxine et mitomycine C
Ben Salem et al.	2014	animaux	Aquatique	Gardons (<i>Rutilus rutilus</i>)	métaux	AS, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn
Bozari & Aksakal	2013	végétaux	Terrestre	Maïs (<i>Zea mays</i> L.)	organique	Trifluraline (herbicide)
Cambier et al.	2010	animaux	Aquatique	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	métaux	Cd
Cansaran-Duman et al.	2011	végétaux	Aquatique	Lichen (<i>Evernia prunastri</i>)	métaux	Cr, PB, Mn, Zn
Castano et Becerril	2004	animaux	Aquatique	Cellules gonades truites (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	organique	B(a)P
Cenkci et al.	2009	végétaux	Terrestre	Haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	métaux	Hg, B, Cr et Zn
Cenkci et al.	2010	végétaux	Terrestre	Plante brassicaceae (<i>Brassica rapa</i>)	métaux	Pb
Cesniene et al.	2010	végétaux	Terrestre	Plante (<i>Tradescantia</i>)	poly contaminés	Sols terrain militaire : ammoniac, acide nitrique
Dhakshanaamoorthy et al.	2011	végétaux	Terrestre	Arbuste (<i>Jatropha curcas</i> L.)	physique	Rayon gamma
Doganlar	2012	végétaux	Aquatique	Plantes aquatiques (<i>Lemna minor</i> & <i>Lemna gibba</i>)	organique	Quizalofop- <i>p</i> -ethyl (herbicide)
El-Maarouf-Bouteau et Enan	2011	végétaux	Terrestre	Graines de tournesol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	biologique	Moississures
Erturk et al.	2006	végétaux	Terrestre	Haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	métaux	Pb, Cu, Mn et Cd
	2013	végétaux	Terrestre	Maïs (<i>Zea mays</i> L.)	métaux	Co et Ni
Galindo et al.	2010	animaux	Aquatique	Poisson (<i>Prochilodus lineatus</i>)	métaux	Al

Tableau I-2 : Articles scientifiques traitant de la RAPD en écotoxicologie présentés par ordre alphabétique des auteurs (suite)

Auteur	Année	Animaux Végétaux	Aquatique Terrestre	Modèle d'étude	Types de contaminants	Substance(s)
Geoffroy et al.	2012	animaux	Aquatique	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	nanoparticule	Nanoparticule d'or (AuNPs)
Gjorgieva et al.	2013	végétaux	T terrestre	Grande ortie (<i>Urtica dioica</i>)	métaux	Cd Cu Mg Mn Na Ni Pb et Zn
Guida et al.	2010	végétaux	Aquatique	Embryon d'oursin (<i>Paracentrotus lividus</i>)	biologique	Liquide Amniotique humain
Gupta et al.	2009	végétaux	Aquatique	Plantes (<i>Hydrilla verticillata</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i>)	métaux	Cd, Hg et Cu
Hagger et al.	2005	animaux	Aquatique	Embryon et larve de moule (<i>Mytilus Edulis</i>)	radioactivité	Tritium
Kelcec	2010	végétaux	T terrestre	Blé (<i>Triticum aestivum</i>), Haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	métaux	B
Kelcec et al.	2009	végétaux	T terrestre	Mais (<i>Zea mays L.</i>)	métaux	B
Korpe et Aras	2011	végétaux	T terrestre	Graines d'Aubergine (<i>Solanum melongena L.</i>)	métaux	Cu
Lee et al.	2013	végétaux	T terrestre	Sarasin (<i>Fagopyrum Esculentum</i>)	nanoparticule	Nanoparticules de ZnO et CuO
Lerebours et al.	2013	animaux	Aquatique	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	divers	Hg, Uranium, hypéroxye
Liu et al.	2007	végétaux	T terrestre	Riz (<i>Oryza sativa</i>)	métaux	Cd
Liu et al.	2009	végétaux	T terrestre	Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	métaux	Cd
Lui et al.	2012	végétaux	T terrestre	Plantules <i>Arabidopsis</i>	métaux	Cd
Mahrous et al.	2006	animaux	Aquatique	Poisson Tilapia du Nil	biologique	Myco toxine sterigmatocystine
Mat et al.	2013	animaux	Aquatique	Huitre (<i>Crassostrea gigas</i>)	biologique	Microalgue toxique (<i>Alexandrium minutum</i>)
Mohanty et al.	2009	animaux	Aquatique	Poisson rohu (<i>Labeo rohita</i>)	organique	Carbofuran
Nan et al.	2013	animaux	Aquatique	Loche (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	organique	8-hydroxyquinoline (8-HOQ)
Orteux et al.	2011	animaux	Aquatique	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	métaux	Cd et Zn
Ozakca & Sliab	2013	végétaux	T terrestre	Oignons (<i>Allium cepa</i>)	organique	Flusilazole
Plaite et al.	2013	animaux	Aquatique	Daphnies (<i>Daphnia magna</i>)	radioactivité	Uranium
Rocco et al.	2010	animaux	Aquatique	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	organique	Produits pharmaceutiques :
Rocco et al.	2011	animaux	Aquatique	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	organique	Diclofenac, Carbamazépine
Rocco et al.	2012	animaux	Aquatique	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	organique	Gemfibrozile, atorvastatine, sildenafille, citrate
Sakar et al.	2011	végétaux	T terrestre	Arbuste (<i>Dattopha curcas L.</i>)	métaux	Ni
Sunar et al.	2013	végétaux	T terrestre	Mais (<i>Zea mays L.</i>)	biologique	Extraits méthanoliques de Liseron des champs
Swaileh et al.	2008	végétaux	T terrestre	Avoine (<i>Avena sativa</i>)	mixte	Effluents d'eaux usées
Taspinar et al.	2009	végétaux	T terrestre	Fève (<i>Vicia Faba</i>)	métaux	Se 4+ et Cd 2+
Theodorakis et al.	2001	animaux	T terrestre	Rat-kangourou (<i>Dipodomys merriam i</i>)	radioactivité	Radionucléides
Tuney et al.	2007	végétaux	Aquatique	Algue verte (<i>Ulva lactuca</i>)	métaux	Cu
Zhiyi and Haowen	2004	animaux	Aquatique	Zebra fish (<i>Danio rerio</i>)	organique	Phosphamide et diomethoate
Zhou et al.	2011	animaux	Aquatique	Clitè marin (<i>Euplores vannerus</i>)	organique	Nitrofurazone

- Principe de la méthode

La RAPD est une méthode d'amplification aléatoire de l'ADN dérivée de la technique PCR. A la différence de cette dernière qui requiert un couple d'amorces ciblé sur une partie du génome à amplifier, les réactions RAPD-PCR sont réalisées avec une seule amorce de courte séquence (8 à 12 nucléotides) définie arbitrairement. L'autre grande distinction avec des amplifications classiques vient de la température d'hybridation qui est souvent très faible (34 à 38°C contre >50°C en PCR classique). Après amplification, les fragments (amplicons) sont visualisés sur gel d'agarose à la suite d'une électrophorèse (De Wolf et al., 2004 ; Atienzar et Jha, 2006). L'analyse en RAPD des signes de génotoxicité repose sur la comparaison des profils d'amplification obtenus entre échantillons témoins et exposés (Figure I-7). Chaque modification (disparition, apparition, augmentation ou diminution d'intensité des amplicons) le long du profil analysé chez des individus exposés à un contaminant peut être reliée à un effet génotoxique (De Wolf et al., 2004; Atienzar et Jha, 2006). Cette analyse des profils est l'étape la plus importante mais également la plus délicate.

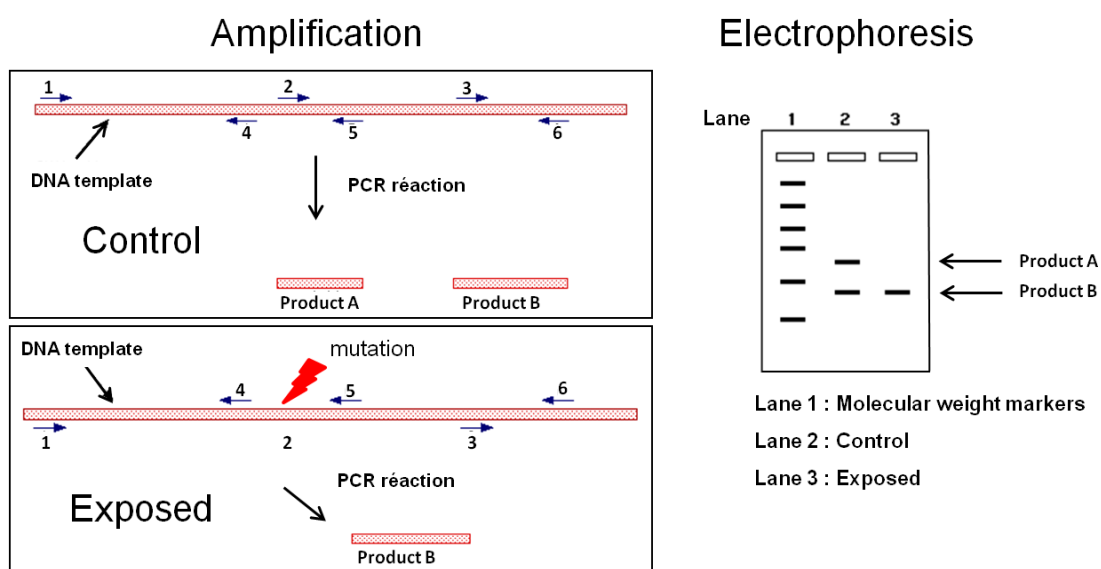


Figure I-7 : Résumé des principales étapes de la méthode RAPD

(modifiée d'après <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapid.html>)

- Avantages et inconvénients

L'un des principaux avantages de cette méthode est qu'aucune connaissance préalable du génome de l'organisme étudié n'est nécessaire. La RAPD a le potentiel de détecter un large éventail de dommages à l'ADN (adduits d'ADN, cassure de l'ADN,...) et la présence d'éventuelles mutations (insertions, réarrangements, délétions). Cette technique nécessite de petites quantités d'ADN (quelques ng suffisent).

La mise au point de la RAPD peut être laborieuse car la réaction d'amplification est très sensible aux quantités de réactifs (dNTPs, Mg^{2+} , enzyme) et à la qualité de l'extrait d'ADN à amplifier. Du fait de sa sensibilité et surtout de la faible température d'hybridation utilisée, des amplifications parasites peuvent survenir au cours de la réaction (De Wolf et al., 2004 ; Atienzar et Jha, 2006). Cependant, une fois mise au point sur le modèle d'intérêt, cette technique permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

La méthode RAPD est surtout qualitative et au mieux semi-quantitative : elle ne permet pas de quantifier réellement le nombre de mutations engendrées par une exposition à un contaminant. Elle permet par contre un large balayage du génome afin de détecter des effets potentiels des substances testées. Plusieurs types de mutations ou dommages à l'ADN peuvent donner les mêmes modifications sur un profil, ce qui rend difficile l'interprétation des changements détectés (Figure I-8).

Direct effect of DNA damage and mutation on RAPD profiles			
DNA alterations	Consequences	Effects on RAPD profiles	Probability to detect the lesion by RAPD
 DNA adduct	→By pass → processivity affected	→Decrease in band intensity/band loss	Medium
	→By pass → processivity not affected	→No effect	
	→Block → dissociation enzyme adduct	→Band loss	Low
	→Block → dissociation → more free Taq	→Increase in band intensity	Medium
	→Block → no dissociation	→Band loss	Low
	→No primer/DNA association (adduct within the priming site)	→Band loss	Low
 DNA breakage	→Block → dissociation enzyme DNA	→Band loss	Low
 Point mutation	→No primer/DNA association	→Band loss	Low
 Rearrangement	→Creation of a new annealing site	→Appearance of band	Low
	→Loss of pre-existing annealing site	→Band loss	Low
	→New priming site	→Appearance of band	High

For more details please refer to the text. ●: DNA adduct; —: DNA breakage; ●: Taq DNA polymerase; — — —: DNA synthesis; ×: point mutation; |||||: 10-mer primer.

Figure I-8 : Relation entre altérations de l'ADN et effet sur les profils RAPD

(Atienzar et Jha, 2006)

L'analyse des profils est réalisée le plus souvent de façon visuelle, la méthode est donc très subjective et l'interprétation observateur-dépendante, même si certains auteurs utilisent des logiciels de traitement d'image. Globalement, la qualité de la migration (non linéaire ; Liu et al., 2009), la mauvaise séparation des amplicons (Swaileh et al., 2007) et les photographies issues des électrophorèses de mauvaise qualité (Gupta et Sarin, 2009 ; Ben Salah-Abbès et al., 2009) compliquent l'analyse des profils. Cambier et al. (2010) ont développé une méthode d'analyse des profils de la PCR quantitative (qPCR) en utilisant les courbes de fusion des produits RAPD au lieu de l'approche post-électrophorèse. En effet, avec l'approche classique,

il est difficile d'interpréter les faibles différences entre profils témoins et contaminés lors d'expositions à de faibles doses de substances chimiques. Malgré cela, Cambier et al. (2010) ont indiqué que la résolution des amplicons après séparation sur gel d'agarose reste plus élevée que celle obtenue avec les courbes de fusion.

- Utilisation de la RAPD sur modèle terrestre

Suite à la recherche bibliographique sur l'utilisation de la méthode RAPD en écotoxicologie, il s'avère que la moitié des études concerne des organismes terrestres et l'autre des organismes aquatiques (Figure I-6). Chez ces derniers, la majorité des études RAPD sont réalisées sur des modèles animaux (80%) alors que pour les organismes terrestres cette méthode est quasi-exclusivement utilisée sur des modèles végétaux. A l'heure actuelle, la seule publication disponible chez un organisme animal terrestre concerne un rongeur du désert, le rat-kangourou *Dipodomys merriami* (Theodorakis et al., 2001). La méthode RAPD a été utilisée sur de l'ADN extrait de la rate d'individus vivants dans des zones contaminées ou non par des éléments radioactifs. Cependant aucun effet génotoxique n'a pu être mis en évidence.

Peu d'études RAPD ont été réalisées chez des stades embryonnaires. Seulement 2 publications sont disponibles chez des organismes invertébrés aquatiques. Hagger et al. (2005) ont démontré un effet génotoxique du tritium (HTO) dès 0,37 kBq/mL sur les embryons de moule *M. edulis*. Guida et al. (2010) ont utilisé la RAPD pour mettre en évidence des effets génotoxiques chez des embryons d'oursin (*Paracentrotus lividus*) après exposition à des liquides amniotiques provenant de femmes enceintes vivants dans des zones de décharges.

En résumé

L'étude de la génotoxicité des contaminants métalliques et organiques utilisés au cours de cette thèse a été réalisée par la méthode RAPD. Elle semble particulièrement adaptée au modèle embryonnaire car elle ne nécessite pas d'étape de dissociation cellulaire délicate comme lors des tests MN ou comète. De part la large gamme de dommage à l'ADN qu'elle est susceptible de détecter, cette approche peut être intéressante dans le cadre d'une première étude du potentiel génotoxique de substances chimiques chez les stades embryonnaires de l'escargot terrestre *Helix aspersa*.

I.4. Les Méthallothionéines

Les escargots terrestres adultes possèdent de fortes capacités d'accumulation et de résistance vis-à-vis des éléments traces métalliques (ETMs). Ces facultés sont liées en partie à la présence de systèmes de détoxification, les méthallothionéines (MTs), qui sont capables de séquestrer certains éléments comme le Cd ou le Zn dans les tissus digestifs (Dallinger et Wieser 1984 ; Chabicoovsky et al., 2003). Druart et al. (2010) ont montré que les embryons d'*H. aspersa* possèdent une faible sensibilité au Cd (de l'ordre du mg/L). Une partie de nos travaux a concerné l'étude des MTs afin de déterminer si ces systèmes de défense métal-spécifiques sont présents et actifs chez les stades embryonnaires de l'escargot et s'ils interviennent en réponse à des expositions au Cd. Ces recherches sur l'expression des gènes codant les MTs chez l'embryon d'escargot ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Professeur Reinhard Dallinger (Institut de Zoologie de l'Université d'Innsbruck en Autriche).

I.4.1. Généralités

Les MTs sont des protéines de faible masse moléculaire (6 à 10 kDa) découvertes et isolées à partir de tissus rénaux de chevaux en 1957 par Margoshes et Vallee. Chez les mammifères, elles sont constituées de 60 à 68 acides aminés et présentent une teneur élevée (en général 20) en cystéine (Cys) et une absence d'acides aminés aromatiques (Fowler et al., 1987). La protéine est composée de 2 domaines α et β séparés par une partie centrale sans Cys (Figure I-9). Dans la structure primaire des MTs, les résidus Cys sont disposés en suivant des répétitions de type : Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, où X est un acide aminé différent de la Cys (Babula et al., 2012). Cet arrangement séquentiel des résidus Cys a une importance primordiale dans la formation de complexes permettant de lier des ions comme le Zn^{2+} , le Cd^{2+} et le Cu^+ (Figure I-9).

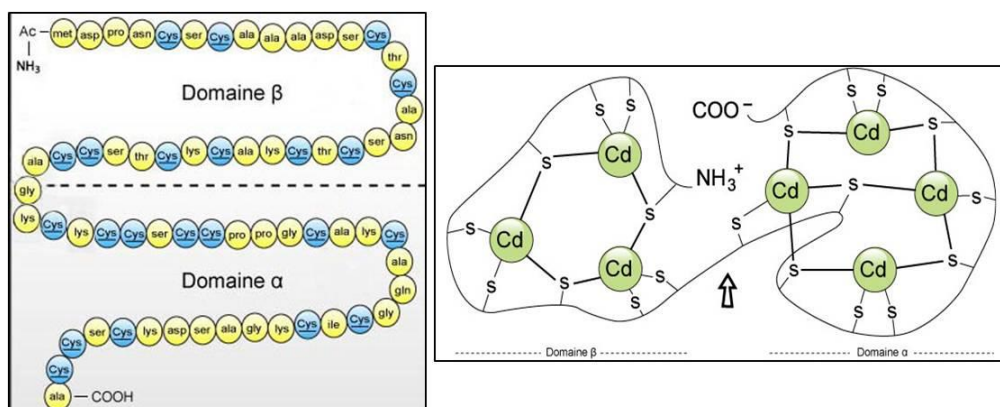


Figure I-9 : Structure primaire des méthallothionéines

(d'après http://www.cima.ualg.pt/piloto/UVED_Geochemie/UVED/site/html/2/2-3/2-3-3/2-3-3-5.html)

I.4.2. Rôles

Les MTs possèdent plusieurs rôles comme la fixation intracellulaire des éléments essentiels (Zn et Cu), le contrôle des concentrations des ions libres de ces éléments et la régulation de leur distribution vers leurs destinations cellulaires. Enfin, elles interviennent dans la neutralisation des effets de substances toxiques via la séquestration d'éléments non essentiels (cadmium et mercure ; Kägi et Schäffer, 1988). Ces protéines ont donc une fonction importante dans l'homéostasie et/ou la détoxification des métaux chez de nombreux organismes (Kägi, 1991; Egli et al., 2006 ; Klaassen et al., 2009) ainsi que dans la défense vis-à-vis du stress oxydatif (Thornalley et Vasák, 1985 ; Abel et Deruiter, 1989 ; Kang, 1999).

I.4.3. Classifications

Binz et Kägi (1999) ont déterminé 15 familles de MTs suite à des alignements des séquences protéiques connues chez différents organismes et à la réalisation d'arbres phylogénétiques. Le tableau ci-dessous résume la classification réalisée.

Tableau I-3 : Classification simplifiée des métallothionéines (d'après Binz et Kägi, 1999)

Famille	Noms	Groupes (nombre de sous-groupes)	Nombre d'Acides Aminés (AA) et Cystéine conservés (Cys)
1	Vertébrés	mammifères (5), oiseaux (3), batracien (1), anoure (1), téléostéen (1)	60 à 68 AA, 20 Cys
2	Mollusques	moules (2), gastéropodes (1), autres mollusques (1)	64 à 75 AA, 18 à 23 Cys
3	Crustacés		58 à 60 AA, 18 Cys
4	Echinodermes		64 à 67 AA, 20 Cys
5	Diptères		40 à 43 AA, 10 Cys
6	Nématodes		62 à 74 AA, 18 Cys
7	Ciliés		105 AA, 31 Cys
8	Champignons	sous-famille (6)	25 à 56 AA, 7 à 9 Cys
9	Procaryotes		53 à 56 AA, 9 Cys
10	Plantes	6 types différents	45 à 84 AA, 2 régions Cys

I.4.4. Les métallothionéines chez les Mollusques

D'après le Tableau I-3, les MTs chez les mollusques forment une famille à part entière avec les moules qui constituent 2 sous-groupes, les autres mollusques à l'exception des gastéropodes formant un 3^{ème} sous-groupe. Le 4^{ème} sous-groupe est constitué des gastéropodes. Chez ces derniers, de nombreuses études ont été réalisées sur des espèces aquatiques et terrestres. Les gastéropodes constituent l'une des classes du phylum des mollusques les plus riches en espèces dont les isoformes de MT ont été identifiées (Figure I-10). De nombreuses séquences nucléotidiques codant les MTs chez les mollusques sont disponibles sur GenBank.

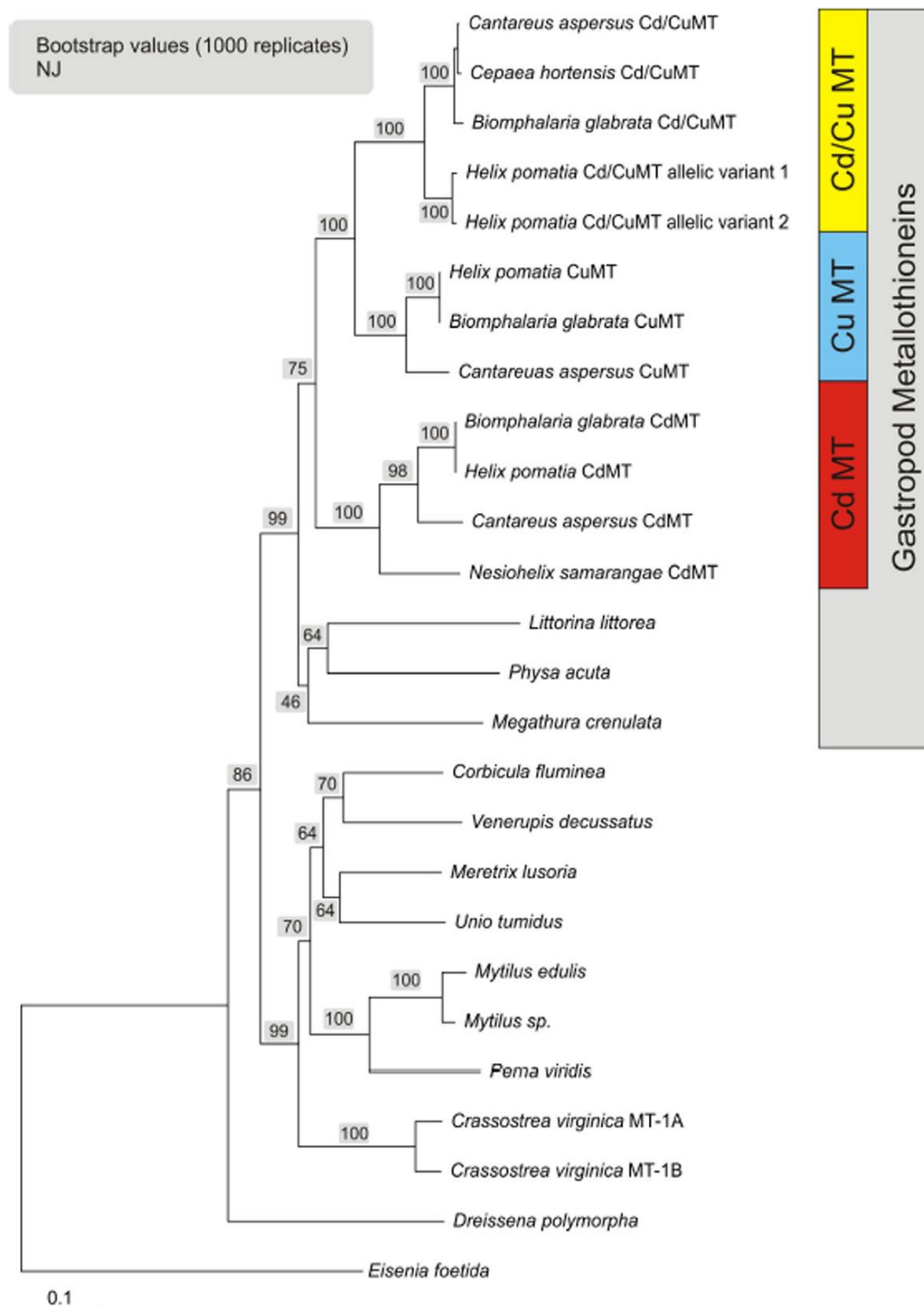


Figure I-10 : Arbre phylogénétique des métallothionéines chez les mollusques construit à partir des séquences nucléotidiques et la méthode du plus proche voisin.

Le ver de terre *Eisenia foetida* a été utilisé comme espèce hors groupe (d'après Palacios et al. 2011)

Des données sont disponibles sur les MTs de mollusques d'organismes modèles aquatiques comme l'huître ou la moule (Geffard et al., 2003). Chez *C. gigas* des variations de quantités de MTs (évalués par la technique Elisa) ont été démontrées dans les gonades durant la gamétogenèse (Meistertzheim et al., 2009). Toujours chez *C. gigas*, *in vitro*, des expositions d'hémocytes à du Cd ont permis de mettre en évidence l'existence d'un niveau seuil (situé entre 5 et 10 μM de Cd) en dessous duquel il n'y a pas d'induction d'ARNm de MTs. Un niveau d'induction maximal a été rapporté pour des concentrations comprises entre 10 et 36 μM de Cd. Pour des concentrations supérieures à 36 μM une diminution du taux des ARNm a été démontrée (Roesijadi et al., 1997). Chez la moule *M. edulis*, 2 gènes (*MT10* et *20*) ont été clonés. Après exposition à 0,4 mg/L de Cd, une augmentation des quantités d'ARNm a été mise en évidence par *Northern blot* (Barsyte et al., 1999). Cette technique a également permis de démontrer une augmentation de l'expression des gènes *MT10* et *MT20* chez des moules exposées au Cu (35 ppb) et à du pétrole (0,3 mL/L) pendant 10 jours (Lilja et al., 2008). Chez *M. galloprovincialis*, l'expression des gènes de *MT* a été étudiée par qPCR et les résultats ont montré que le gène *MT10* est induit par le Cd, le Zn et le Cu alors que le gène *MT20* est activé par le Cd et l' H_2O_2 . Chez le bigorneau *Littorina littorea*, English (2003) a identifié la séquence nucléotidique codant une MT et démontré par *Northern* qu'elle était surexprimée en réponse à des stress environnementaux (anoxie et froid) dans l'hépatopancréas et le muscle du pied. Après exposition au Cd (400 $\mu\text{g/L}$ pendant 1 mois), une augmentation des quantités de MTs a été démontrée dans les branchies et le foie de cette même espèce (Bebianno et al., 1992 ; Bebianno et Langston, 1995).

I.4.4.1. Chez les gastéropodes pulmonés

Les MTs ont été identifiées chez plusieurs espèces d'escargots terrestres comme *Cepaea hortensis*, *Helix aspersa* (*C. aspersus*), *H. pomatia*, *Arianta arbustorum*, *Nesiohelix smarangea* et *Biomphalaria glabrata* chez les aquatiques. Un alignement des séquences protéiques des MTs chez ces gastéropodes permet de mettre en évidence 3 grands groupes représentés par chacune des 3 MTs classiquement trouvées chez ces espèces : la CdMT, la CuMT et la Cd/CuMT (Palacios et al., 2011 , Figure I-11)

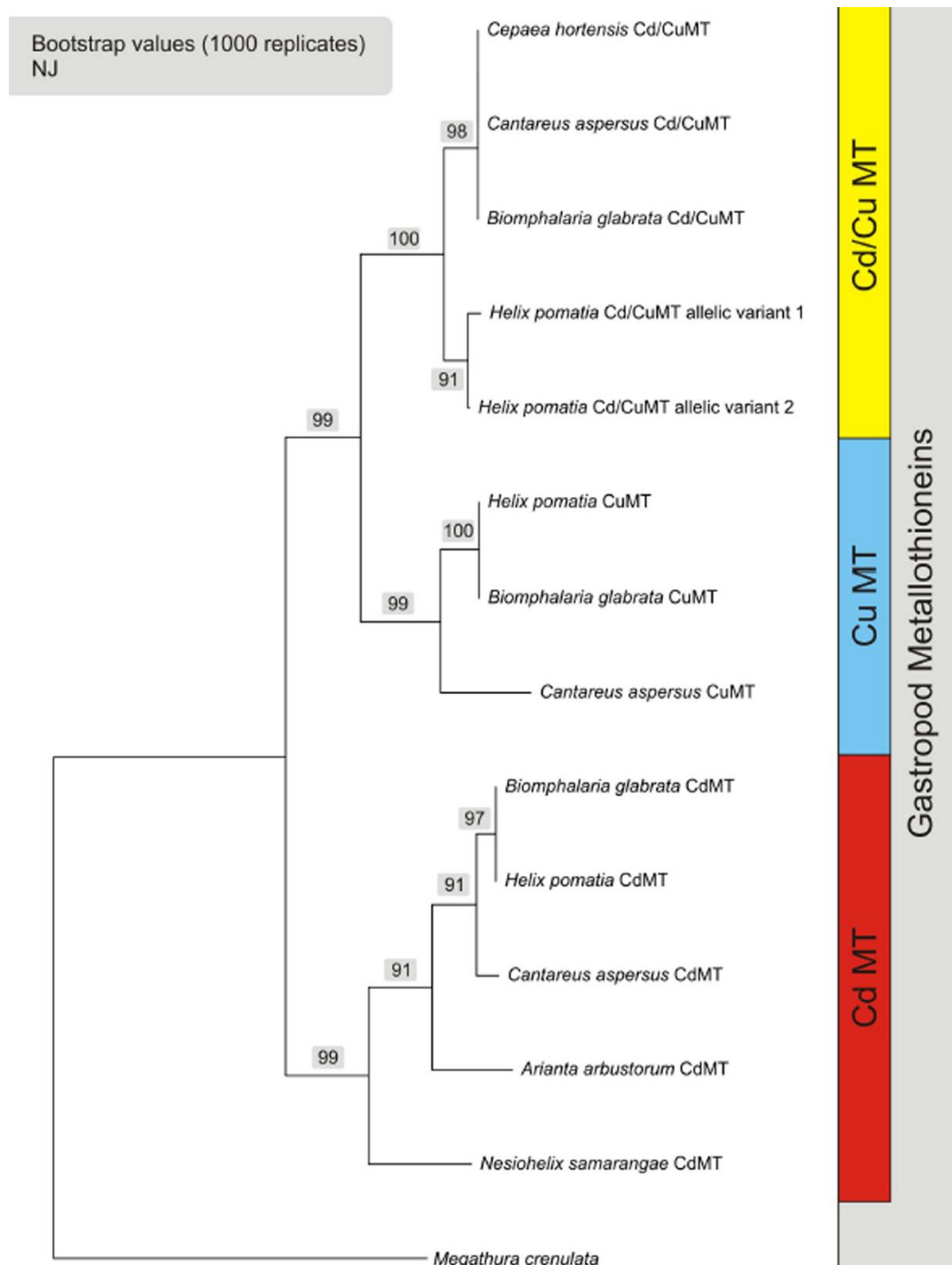


Figure I-11 : Arbre phylogénétique des métallothionéines chez les gastéropodes construit à partir des séquences d'acides aminés et la méthode du plus proche voisin.

Megathura crenulata a été utilisée comme espèce hors groupe (d'après Palacios et al. 2011)

Chez *A. arbustorum*, deux isoformes de MTs (MTa et MTb) ont été isolées par HPLC. Leurs structures sont quasiment identiques (à un acide aminé près) et présentent un fort taux de similarité avec la séquence de la CdMT connue chez *H. pomatia* (Berger et al., 1995). Pérez-Rafael et al. (2012) ont démontré chez le gastéropode marin *Megathura crenulata* que

la seule MT connue est peu spécifique avec un rôle suspecté dans diverses fonctions physiologiques (détoxification (Cd), homéostasie (Cu), stress oxydatif, « nettoyage du Zn »).

Chez l'escargot de Bourgogne *H. pomatia*, espèce très proche d'*H. aspersa*, les MTs ont fait l'objet de nombreuses études en particulier par l'équipe du Professeur Dallinger spécialiste reconnu des MTs chez les escargots hélicidés notamment. Deux isoformes ont été identifiées et très bien caractérisées, différant par leurs structures et leurs spécificités. La première, le peptide spécifique du Cd (HpCdMT) isolée à partir d'hépatopancréas (Dallinger and Rainbow, 1993), est capable de séquestrer 85 à 95% du Cd accumulé dans les tissus (Dallinger et al., 1997). Son lieu de synthèse majoritaire est situé dans les cellules d'hépatopancréas mais aussi de façon moins importante dans les cellules épithéliales du pied, du foie ou de l'intestin (Chabicozsky et al., 2003 ; Palacios et al., 2011). Sa sélectivité vis-à-vis du Cd a été démontrée ainsi que son rôle dans la détoxification de ce métal non essentiel dans les tissus digestifs (Chabicozsky et al., 2003). Chabicozsky et al. (2004) ont démontré l'existence d'une capacité maximale de liaison du Cd par la HpCdMT laissant supposer des capacités de détoxification limitées.

La seconde isoforme, initialement isolée à partir du manteau, est synthétisée dans un type de cellules appelées rhogocytes qui sont les sites de synthèse de l'hémocyanine (protéine comportant des atomes de Cu pour le transport de l'oxygène dans l'hémolymphe des mollusques) (Chabicozsky et al., 2003). Elle est exclusivement associée au Cu (HpCuMT ; Berger et al., 1997) et intervient dans la régulation de ce métal en lien avec la synthèse d'hémocyanine (Dallinger et al., 1997 ; Dallinger, 2005). L'existence d'une troisième isoforme mixte chez cette espèce a été rapportée par Palacios et al. (2011).

I.4.4.2. Chez le petit-gris *Helix aspersa*

Chez cette espèce, Hispard et al. (2008a) ont isolé et caractérisé 3 isoformes à partir de cellules digestives. La première est l'isoforme spécifique du Cu (CuMT) et présente une structure semblable à celle de l'escargot de Bourgogne. La deuxième est l'isoforme spécifique du Cd (CdMT) avec une structure protéique très proche de celles déjà découvertes chez *H. pomatia* ou *A. arbustorum*. Une étude par PCR a permis de démontrer une surexpression du gène codant cette isoforme par le Cd. Une troisième isoforme (CdCuMT), jamais encore détectée chez les gastéropodes, a été identifiée et caractérisée pour la première fois chez *H. aspersa* (Hispard et al., 2008a). Elle possède une structure intermédiaire entre la Cu et la CdMT et montre des différences dans sa séquence protéique (Schuler et al., 2008) avec les 2 autres MTs (Figure I-12). Cette isoforme mixte, semble être en mesure de fixer des atomes de Cd et Cu mais n'a montré aucune spécificité vis-à-vis du Cd et Cu (Hispard et al., 2008a).

1 10 20 30 40 50 60

| | | | | | | | | | |

SGRG--QNCGGACNSNPCNCNGDCNCGTGCNCDCQCSARHCSNDDCKGSGQCTRSGSCKCGNACGCK - CuMT

| | | | | | | | | | |

SGKGKGGEKCTAACRNEPCQCGSKCQCGEGCTCAACKTCNCTSDGCKCGKECTGPDSCCKGSSCGCK - CdMT

| | | | | | | | | | |

SGKG--SACAGSCNSNPCSCGDDCKGAGCSCAQCYSCQCNNDTKCGSGQSTSGSCKCG-SCGCK - Cd/CuMT

Figure I-12 : Séquences primaires des 3 métallothionéines identifiées chez l'escargot adulte *Helix aspersa*.

Ces séquences sont disponibles sur GenBank sous les références ABM55268 (CuMT), ABL73910 (CdMT) et ABM92276 (Cd/CuMT).

Les 3 séquences protéiques diffèrent seulement par quelques résidus non-Cys, prouvant l'importance de ces acides aminés dans la détermination de la spécificité métallique de chaque isoforme (Palacios et al., 2011 ; Schuler et al., 2008).

I.4.5. Les gènes des métallothionéines

Les MTs constituent une famille multi-génique. Chez l’homme, elles sont codées par une famille qui contient de nombreux gènes fonctionnels (10) ou non fonctionnels (7) (Garrett et al., 1998). Deux isogènes sont connus chez la moule (Barsyte et al., 1999) alors que 5 gènes sont identifiés chez l’embryon d’oursin *P. lividus* (Ragusa et al., 2012).

I.4.5.1. Expression des gènes des métallothionéines chez *Helix aspersa*

Hispard et al. (2008a) et Höckner et al. (2011) ont cloné et séquencé les ADNc des 3 isoformes de MTs identifiées. Les séquences d'ADNc sont disponibles dans GenBank sous les références EF178297 (*CuMT*), EF152281 (*CdMT*) et EF206312 (*CdCuMT*).

L'expression des transcrits a été étudiée par qPCR chez des escargots adultes exposés à des laitues contaminées au Cd ou au Cu durant 29 jours. Les résultats ont montré que seul le gène *CdMT* était surexprimé chez les escargots exposés au Cd, l'expression des 2 autres gènes restait inchangée. Chez les exposés au Cu, seul le gène *CuMT* était surexprimé (Figure I-13).

Chez les adultes, le taux d'expression du gène *CdCuMT* est le plus faible des 3 gènes étudiés et n'est induit ni par le Cd, ni par le Cu. Un rôle marginal dans la régulation des métaux a donc été assigné à cette isoforme mixte qui ne serait en fait qu'un reliquat de l'évolution des MTs chez les escargots pulmonés (Höckner et al., 2011 ; Palacios et al., 2011).

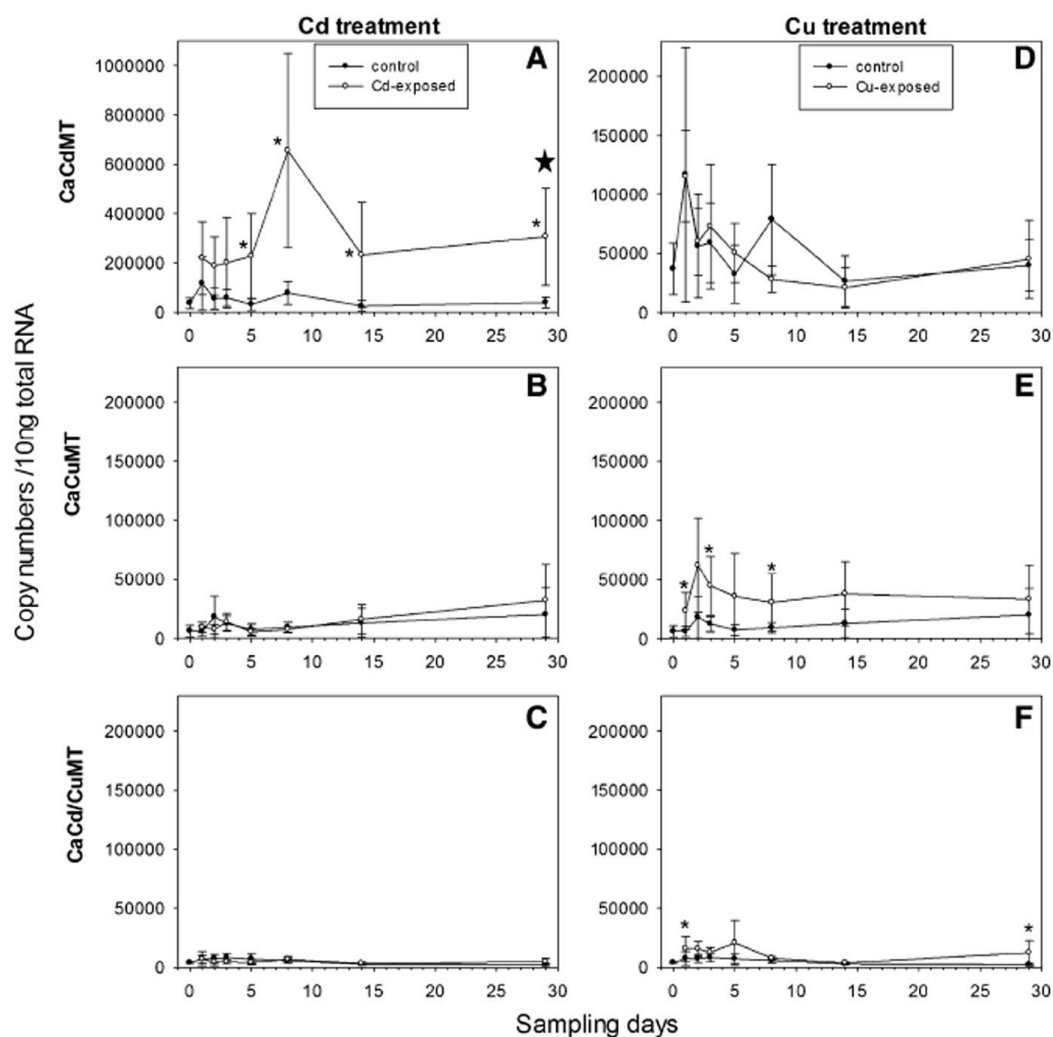


Figure I-13 : Expression des 3 gènes codant les isoformes de métallothionéines connues chez l'adulte *Helix aspersa* pendant une exposition de 29 jours à des laitues contaminées par du Cd ou du Cu.
(d'après Höckner et al. 2011)

I.4.6. Les métallothionéines chez les embryons

Aucune donnée n'est disponible sur la présence des MTs (au niveau protéique comme au niveau moléculaire) chez les embryons d'escargots terrestres. De même, pour cette partie du cycle de vie, il n'existe aucune donnée sur la régulation des MTs en condition de stress métallique.

Comme pour les études d'embryotoxicité et de génotoxicité, les données les plus nombreuses concernant les MTs et leurs régulations après expositions à des métaux sont disponibles chez les embryons d'organismes modèles aquatiques. A titre d'exemple, il a été montré chez des larves d'huitre *Crassostrea gigas* après 12 heures d'exposition au Cd (0,005 à 0,2 μ M) une induction de l'expression des ARNm de MTs chez des embryons (Roesijadi et al., 1996) et des larves âgées d'une semaine (Roesijadi et al., 1995). Chez la même espèce, Damiens et al. (2006) ont montré un doublement rapide des concentrations de MTs chez les

exposés. Hwang et al. (2012) ont montré par RT-PCR une augmentation dose-dépendante de l'expression d'ARNm de *MTs* chez des embryons d'oursin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) exposés à 25 ppm de Ni.

Depuis quelques années, le développement de la PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) permet une étude plus sensible et haut débit de l'expression des transcrits (comparativement aux méthodes classiques de RT-PCR et de *Northern blot*). La qPCR a permis de montrer une augmentation du taux de transcrits d'un gène de *MTs* chez les larves de moules zébrées (*Dreissena polymorpha*) après des expositions au Cd et Hg (Navarro et al., 2011). L'expression des 5 isogènes de *MTs* (*PIMT4* à 8) connus chez l'embryon d'oursin *P. lividus*, a également été étudiée en réponse à des doses subléthales de Cd. Ragusa et al. (2012) ont ainsi rapporté que 2 des 5 gènes avaient une expression constitutive et étaient surexprimés suite à l'exposition au Cd. Les 3 autres gènes étudiés ne s'exprimaient qu'en réponse au Cd. Il a été également rapporté que chacun de ces gènes possède un seuil propre d'activation en réponse au Cd. Ceci suggérant une réponse hiérarchique de ces gènes pour surmonter les stress environnementaux qui peuvent interférer avec un développement normal de l'embryon (Ragusa et al., 2012).

Russo et al. (2013) ont également utilisé la qPCR pour étudier le gène de *PIMT8* chez la même espèce. Ils ont montré que *PIMT8* était exprimé durant tout le développement embryonnaire et que de hauts niveaux d'expression étaient détectables à la fin du stade gastrula et juste avant l'éclosion. Le rôle des *MTs* durant l'embryogenèse a été également étudié. En effet, Chen et al. (2004) ont démontré par RT-PCR qu'un gène de *MTs* s'exprimait dès les 1^{ers} stades de l'embryogenèse chez le poisson zèbre. Olsson et al. (1990) ont étudié, par *Northern*, l'expression d'ARNm de *MTs* d'embryons en développement chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Un rôle des *MTs* dans le développement et la différenciation des tissus a été suggéré par ces auteurs.

En résumé

Les *MTs* et leurs relations avec la régulation des métaux sont très étudiées chez les escargots terrestres adultes. Les propriétés et les rôles de 2 des 3 isoformes identifiés (Cu et Cd) sont connus chez les adultes de même que la régulation des gènes codants ces protéines lors de stress métalliques. Cependant, aucune donnée n'est disponible sur la présence et le rôle des *MTs*, ainsi que sur la régulation des gènes de *MTs*, chez les stades embryonnaires d'*Helix aspersa* aussi bien en condition normale qu'en cas d'exposition aux métaux.

I.5. Modèle biologique étudié : l'escargot *Helix aspersa*

L'escargot *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* O.F. Müller, 1774) communément appelé petit-gris, est un mollusque gastéropode pulmoné qui fait partie de l'ordre de stylommatophores, de la famille des helicidae.



Figure I-14 : Escargot sub-adulte *Helix aspersa*

(<http://www.nhm.org/nature/taxonomy/term/218>)

Il possède une coquille dextre (qui s'enroule de gauche à droite), de couleur brun-jaune avec un diamètre moyen de 30 mm (Figure I-14). Le corps de l'escargot est composé de deux parties distinctes : le pied et les viscères. Le pied lui permet de se déplacer avec un mouvement de glisse aidé par l'émission d'un mucus qui réduit la friction avec les surfaces rugueuses. Il comporte le système nerveux, la partie antérieure du tube digestif, la sole pédieuse et musculuse. Les viscères sont constitués des organes présents dans le tortillon à l'intérieur de la coquille à savoir : le rein, l'hépatopancréas, le cœur et une partie de l'appareil génital qui se prolonge jusque dans le pied.

I.5.1. Biologie et écologie de l'escargot

Le petit-gris est une espèce ubiquiste, originaire des pays méditerranéens et de la façade atlantique française, très répandue en Europe et dans le monde. *H. aspersa* est assez rare dans les champs et les prairies, et préfère fréquenter la périphérie des zones cultivées, les lisières de forêts, voire les milieux forestiers (Kerney et Cameron, 2006). Il a un régime alimentaire non spécialisé composé de plantes (herbacées, graminées, légumes de culture, lichens, certaines céréales, champignons) (Barker, 2001 ; Chevalier et al., 2001). L'escargot mastique ses aliments à l'aide d'une langue râpeuse appelée radula. Le sol fait également partie de son alimentation, et constitue un apport en calcium indispensable à la formation de sa coquille et influençant sa croissance (Gomot et al., 1989 ; Dallinger et al., 2001).

H. aspersa est surtout actif la nuit et en période humide. Les jours trop secs, il entre en estivation en se fixant contre une paroi et en obturant sa coquille d'un voile blanchâtre, l'épiphragme. A partir du mois d'octobre en Europe, l'escargot hiberne en s'enfouissant dans le sol ou en s'abritant des les interstices des murs. Sa coquille est alors obturée par un épiphragme épais. Il reprend généralement son activité au printemps quand les températures avoisinent les 12 - 14°C (Marasco et Murciano, 2003 ; Kerney et Cameron, 2006).

I.5.2. Interêts de l'utilisation de l'escargot en écotoxicologie

Les stades juvéniles et adultes d'*H. aspersa* sont utilisés dans de nombreuses études écotoxicologiques. En effet, de par leur place au sein de l'écosystème terrestre, les escargots sont capables d'intégrer des sources multiples de contamination (sol, atmosphère, végétaux) par diverses voies : digestive, respiratoire et/ou cutanée. Les capacités de résistance et d'accumulation des métaux ont été démontrées chez ces escargots (Scheifler et al., 2002a,b). Les petit-gris sont des bioindicateurs d'exposition et d'effets de polluants métalliques (Gomot, 1997 ; Coeurdassier et al., 2000, 2002a ; Scheifler et al., 2002a,b ; Fritsch et al., 2011) ou organiques (Coeurdassier et al., 2002b, 2011 ; de Vaufleury et al., 2006 ; Regoli et al., 2006). Un bioessai évaluant les effets des substances chimiques et des matrices contaminées sur la survie et la croissance d'*H. aspersa* juvéniles a été standardisé (ISO 15952:2006). *H. aspersa* a également permis de suivre les transferts des divers polluants (organiques, métalliques, radionucléides) dans des chaînes trophiques (Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2000 ; Scheifler et al., 2002b, 2003, 2006 ; Scheifler, 2002 ; Hispard et al., 2008b), ou encore d'évaluer les cinétiques de transfert milieu-escargot (Gimbert et al., 2006, 2008).

I.5.3. Reproduction et ponte

H. aspersa est hermaphrodite : une seule gonade produit les spermatozoïdes et les ovules qui atteignent l'orifice génital par des conduits séparés. Le processus de l'accouplement est complexe, il peut avoir lieu plusieurs fois avant la ponte. Les 2 escargots se positionnent tête-bêche pour échanger leurs spermatozoïdes. Le temps d'accouplement est variable et peut durer plus de 12 heures (Figure I-15).



Figure I-15 : Accouplement d'*Helix aspersa* (<http://www.escargotdessarradelles.fr>)

La fécondation a lieu au niveau de la chambre de fertilisation, une quinzaine de jours après l'accouplement. Les ovocytes fécondés sont entourés d'albumen (secrété par la glande à albumen), qui constitue les réserves nutritives pour le développement embryonnaire, puis d'une coque calcaire (Figure I-16). Pour pondre, l'escargot creuse avec sa tête une cavité de 2-4 cm de profondeur dans le sol, et y dépose une ponte constituée en moyenne d'une centaine d'œufs. La ponte peut durer jusqu'à 36 heures. A une température de 18-20°C, les œufs vont se développer en 12 à 15 jours avant d'éclore. Ensuite les jeunes éclos remontent ensuite en surface, ce qui prend 4 à 5 jours supplémentaires (Lecalve, 1989) avant de pouvoir les apercevoir.

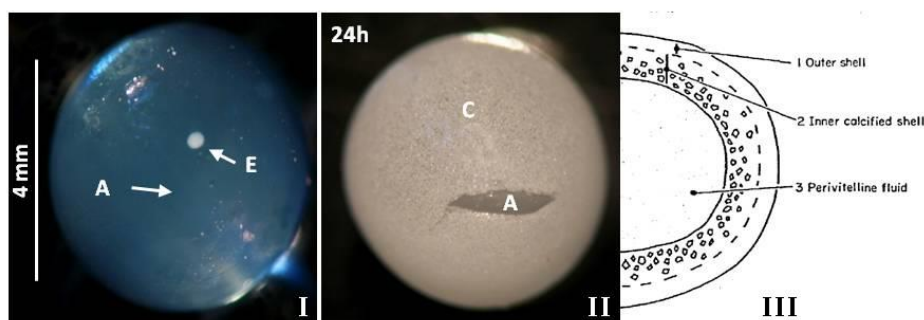


Figure I-16 : Structure de l'œuf d'*Helix aspersa*

Photographies d'œuf de 24 heures sans (I) et avec coque (II) et schéma d'après Bayne, 1968 (III)

Légendes : A albumen ; C, coque calcaire ; E, embryon âgé de 24 heures visible par transparence dans l'albumen gélatineux lorsque l'on a retiré la coque externe de l'œuf.

I.5.4. Développement embryonnaire

La connaissance des différentes étapes du développement embryonnaire d'*H. aspersa* s'avère indispensable en vue de la recherche d'effets toxiques de substances chimiques sur le développement (malformations, retards...) comme cela est couramment réalisé chez les espèces aquatiques. Cependant, les œufs d'escargots étant entourés d'une coque opaque, ces observations nécessitent le retrait de cette enveloppe sans léser la membrane périvitelline pour apercevoir l'embryon. Les phases de l'embryogenèse de l'escargot de Bourgogne *Helix pomatia* ont été décrites pour la 1^{ère} fois par Fol (1879-1880) (Figure I-17).

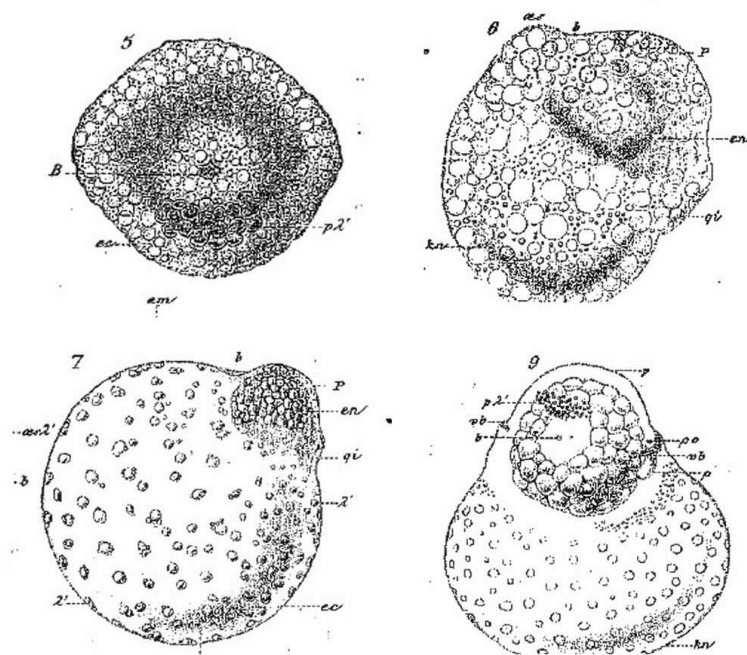


Figure I-17 : Premiers stades embryonnaires chez *Helix pomatia*

(d'après les planches de dessin de Foll 1879-1880). 5 à 9 : stades morula à gastrula, kn : sinus voilier ; P: pied ; b : blastophore ; B : blastocoele

Les travaux d'histologie de Fioroni (1982) ont permis d'améliorer les connaissances sur la mise en place des tissus au cours des premiers stades de l'embryogenèse d'*H. pomatia* (Figure I-18).

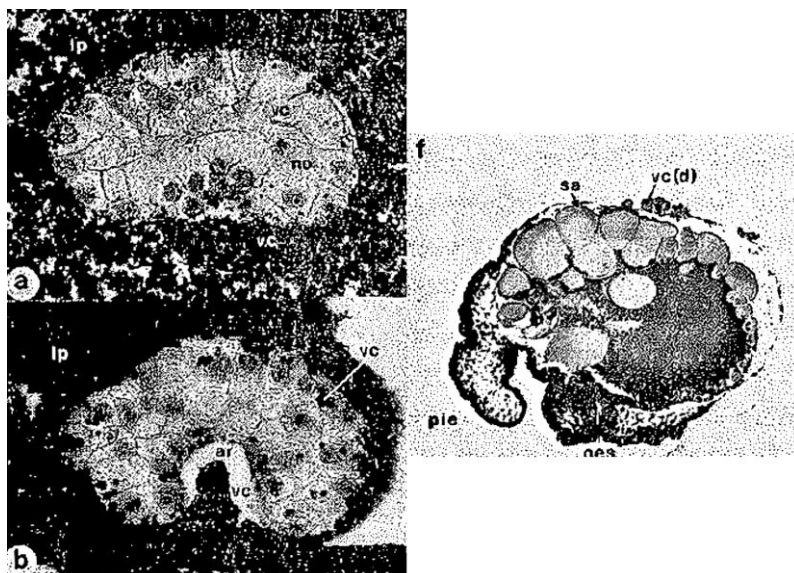


Figure I-18 : Coupe histologique d'embryon d'*Helix pomatia*

(d'après Fioroni 1982). a et b : stades blastula et gastrula (coupes sagittales), f : embryon au stade larvaire (> 7 jours). vc : vacuole d'albumine, pie : pied, oes : œsophage, no : noyaux, sa : sac à albumine, al : albumine

Peu de données sont disponibles sur le développement embryonnaire d'*H. aspersa*, mis à part une étude sur la différenciation du système nerveux au cours de l'embryogenèse du jour 8 à l'éclosion (Ierusalimsky et Balaban, 2001). Une table de développement complète avec des clichés en couleurs des différentes étapes de l'embryogenèse d'*H. aspersa* a été réalisée récemment par Druart et al. (2010) (Figure I-19). L'embryon passe du stade une cellule lors de la ponte au stade morula après 2 à 3 jours de développement par une segmentation totale (stades 2, 4, 8, 16, 32 cellules...). A la fin du stade morula, l'embryon a l'aspect d'une mûre, une cavité appelée blastocœle apparaît. Après 4 jours de développement, deux pôles se distinguent avec apparition de l'ébauche de l'orifice buccal appelé blastopore. Après 6 à 7 jours de développement, l'embryon atteint le stade larvaire qui est caractérisé par le début de l'organogenèse. A ce stade, on distingue les ébauches du pied, de la bouche, du cœur et de l'anus. Après 12 jours, l'embryon ressemble à un petit escargot adulte avec la présence d'une coquille, du manteau, des 4 tentacules dont 2 portent les yeux, d'un pied bien individualisé. Les derniers jours de développement permettent à l'embryon de terminer la différenciation de ses organes et le développement de sa coquille. La phase embryonnaire s'achève après une quinzaine de jours (suivant la température d'incubation) lorsque l'éclosion produit un jeune escargot présentant un reste de substances de réserves dans le tube digestif qui seront résorbées dans les jours qui suivent l'éclosion.

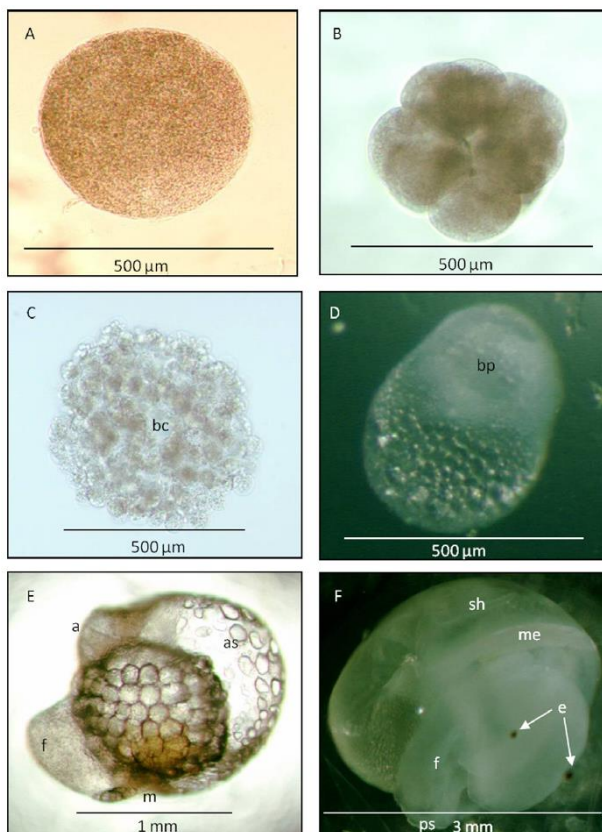


Figure I-19 : Grandes étapes de l'embryogenèse d'*Helix aspersa*

(d'après Druart et al. 2010). Embryon au stade 1 cellule (A, 0-3 heures après fertilisation), 8 cellules (B, 8-12 heures après fertilisation), morula (C, 2-3 jours après fertilisation), gastrula (D, 4 jours après fertilisation) et au stade larvaire (E, 7 jours et F, 12 jours après fertilisation). Légende : a, anus; as, sac antérieur; bc, blastocœle; bp, blastopore; e, yeux sur les tentacules; f, pied ; m, bouche; me, manteau; ps, sinus pedieux; sh, coquille.

I.6. Contaminants étudiés

Au cours de cette thèse, le cadmium a été utilisé comme contaminant modèle car la toxicité de ce métal a été démontrée chez les stades embryonnaires de nombreux organismes (cf I.2.2). Les propriétés génotoxiques du Cd sont également connues chez certains organismes (cf I.3) ainsi que son lien étroit avec les processus de détoxification chez les escargots via l'intervention des métallothionéines (MTs). Le Cd est donc apparu comme étant un contaminant adapté pour la recherche de paramètres de mesure des effets toxiques, la mise au point d'une méthode de mesure de la génototoxicité (RAPD) et l'étude des MTs chez l'embryon d'escargot *H. aspersa*.

I.6.1. Cadmium

Le Cd est un élément chimique de numéro atomique 48 et de masse atomique 112,4 g/mol. Il fait partie du groupe 12 du tableau périodique des éléments. Dans la croûte terrestre, le Cd est naturellement présent à des quantités comprises entre 0.1 et 0.5 ppm. C'est un métal non-essentiel, c'est-à-dire sans rôle biologique chez les organismes vivants. Sa toxicité fait de lui un métal considéré comme un des plus problématiques en termes de santé environnementale (Eisler, 2000). Il est classé par l'*U.S. Environmental Protection Agency* comme polluant prioritaire.

Le Cd est utilisé à près de 80%, dans la fabrication des accumulateurs et des piles Ni-Cd. Cet élément chimique intervient dans divers procédés comme le cadmiage (revêtement protecteur pour l'acier), ou encore en tant que pigments (jaune ou rouge) dont l'utilisation est fortement réglementée par l'Union Européenne. Il intervient également comme stabilisant (anti-UV) dans les plastiques comme le PVC (Figure I-20).

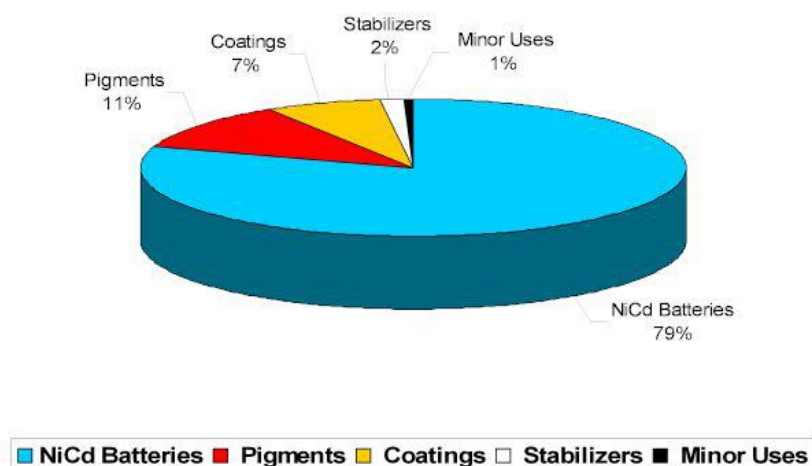


Figure I-20 : Principales utilisations du cadmium

(<http://www.cadmium.org>)

Les niveaux de Cd dans l'environnement ont augmenté de façon drastique entre les années 1800 et 1960. Cette augmentation étant la résultante du fort développement de l'industrialisation (mines d'extraction de métaux primaires, usines rejetant des combustibles fossiles, fabrication de piles...). Les niveaux mesurés dans l'environnement ont diminué depuis la fin des années 1960 du fait de la législation très stricte dans les pays les plus industrialisés. Ainsi en Europe, la Directive 2002/96/EC RoHS (*Restriction of the use of certain Hazardous Substances in electrical and electronic equipment*) limite son usage dans certains produits commercialisés (éclairage et électronique par exemple).

Les activités agricoles sont également émettrices de Cd via les engrais et les fertilisants (Schutze et al., 2003) ou encore via l'épandage de boues parfois issues de stations d'épuration (Bliefert et Perraud, 2001). Les émissions de Cd d'origine anthropique sont estimées entre 8 et 10 kilotonnes par an au niveau mondial soit 90% des émissions totales de Cd dans l'environnement (WHO, 1992).

Toutes ces activités humaines sont donc à l'origine de rejet de Cd engendrant une contamination des écosystèmes. Le Cd est non dégradable et se retrouve le plus souvent dans l'environnement sous sa forme divalente Cd^{2+} (ATSDR, 1993). Ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du Zn et du Ca, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus ou encore d'activer les systèmes de détoxification (MT par exemple) des organismes vivants. En cas de saturation des mécanismes de détoxification, l'accumulation du Cd dans les tissus peut conduire à l'apparition d'effets toxiques.

I.6.1.1. Effets toxiques

Une présentation exhaustive de tous les effets toxiques du Cd chez les vertébrés et invertébrés serait difficilement réalisable car ils sont très documentés. Les paragraphes suivants se limitent donc à des généralités sur les principaux effets.

I.6.1.2. Effets généraux sur les organismes

Chez l'homme une exposition chronique au Cd peut engendrer la survenue d'effets sur les reins, les systèmes respiratoire (dûs principalement à l'inhalation de fumée de cigarette), squelettique, digestif, et reproducteur (Figure I-21 ; Godt et al., 2006).

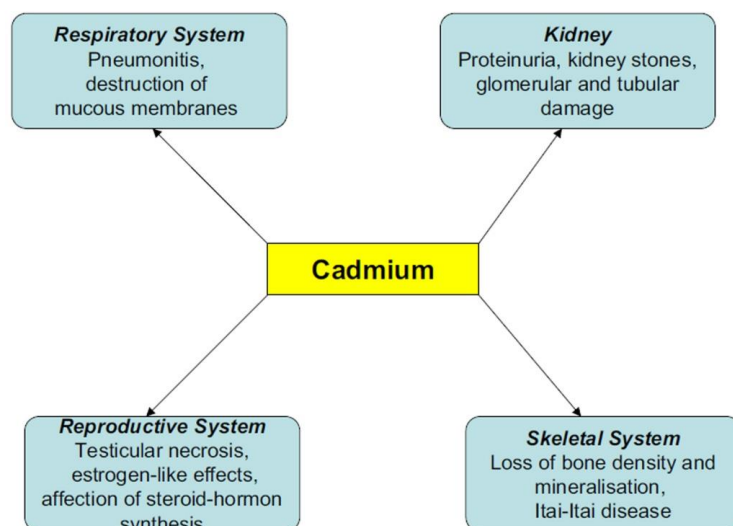


Figure I-21 : Effets du cadmium chez l'homme
(d'après Godt et al. 2006)

Dès 1932, Prodan détecte des dommages sur des organes cibles du Cd (foie, poumons et rein) chez des chats exposés *in vivo* à des fumées contenant des hauts niveaux d'oxydes de cadmium. Chez la souris, le Cd peut induire de phénomènes d'apoptose dans le foie (Habeebu et al., 1998). *In vitro*, des données sont également disponibles, comme chez des lignées cellulaires de truite arc-en-ciel, où le Cd est capable de provoquer des nécroses (Krumschnabel et al., 2010).

I.6.1.3. Effets cancérigènes et mutagènes

L'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classe le Cd comme un agent cancérigène et génotoxique du groupe I. Chez l'homme, le développement de cancers de la prostate, des reins, du foie, du système hématopoïétique (processus permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines) et de l'estomac sont causés par des expositions environnementales ou professionnelles au Cd. Chez le rat, l'inhalation de Cd provoque des effets cancérigènes sur les poumons ainsi que l'induction de tumeurs cancéreuses au niveau de la prostate. L'ingestion de Cd par le rat augmente la survenue de leucémies (Waalkes, 2000).

Le Cd peut entraîner un stress oxydatif via l'augmentation des ROS. La production de ROS est normale pour tous les organismes aérobies. Les cellules possèdent un système de détoxification des ROS assuré par des enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...) et des molécules dites antioxydantes (vitamine E, C...). Lors d'exposition au Cd, un déséquilibre se crée entre la génération de ROS et la production d'antioxydants chez le rat (Ikediobi et al., 2004). Les ROS ont un fort potentiel d'oxydation des molécules type

protéines, ADN, ou lipides constituant les membranes cellulaires. Les effets génotoxiques du Cd ne seraient, à priori, pas dus à des effets directs sur l'ADN mais plutôt indirects via le stress oxydatif (Figure I-22 ; Filipič, 2012).

Une exposition au Cd peut générer une instabilité génomique par l'intermédiaire de dérèglement des systèmes de réparation de l'ADN, des phénomènes d'apoptose et de prolifération cellulaire ainsi que des mécanismes épigénétiques (hyper ou hypo-méthylation des bases de l'ADN) (Filipič, 2012). Ainsi le Cd peut moduler de façon indirecte l'expression de certains gènes.

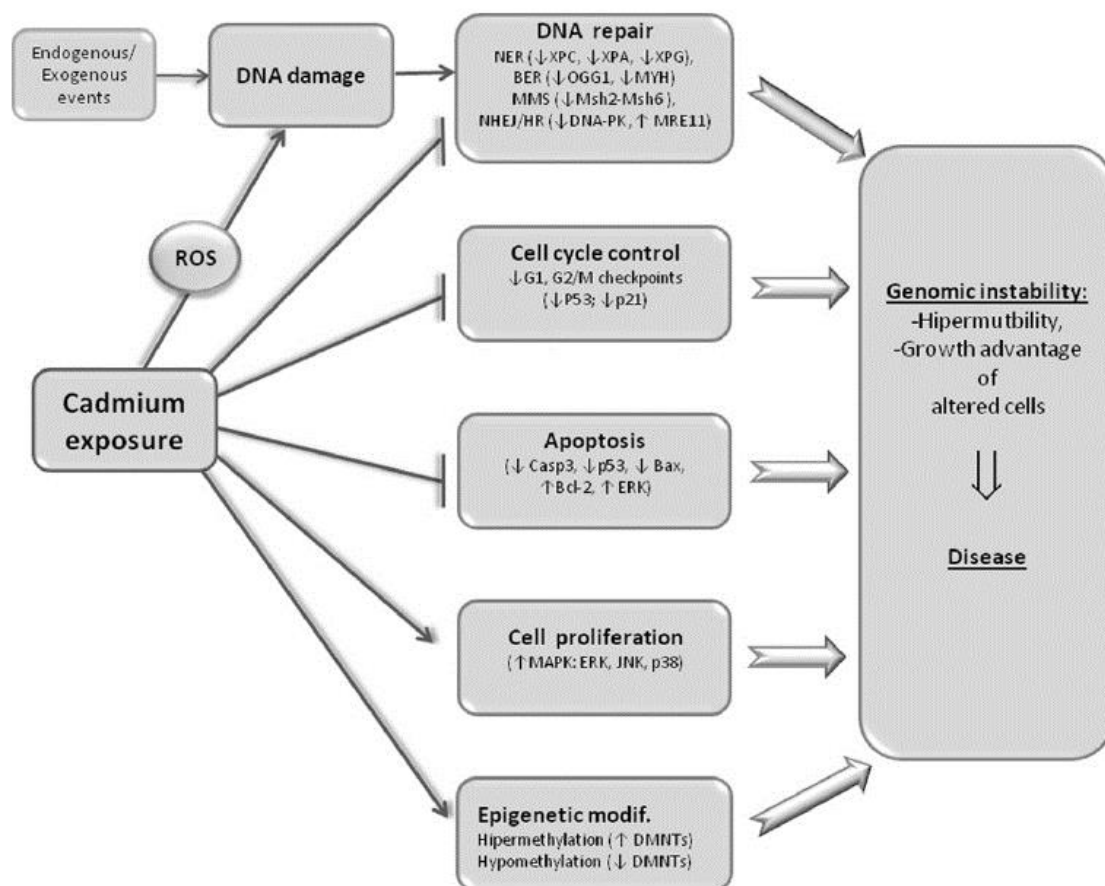


Figure I-22 : Effets toxiques directs et indirects d'une exposition au cadmium (Filipič, 2012)

L'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN engendrée par le Cd et l'augmentation de l'apoptose conduisent à une augmentation du nombre de cellules présentant des dommages à l'ADN (non réparés). La probabilité de développer un cancer ou d'autres maladies associées à l'instabilité génomique est donc elle aussi accrue (Filipič, 2012).

I.6.1.4. Effets chez les embryons

Les effets embryotoxiques du Cd sont connus chez des nombreux organismes : poissons (poisson zèbre, médaka), reptile (lézard), invertébrés aquatiques (gastéropodes, moules, oursins) (cf I.2.3.2). Des données de toxicité sont disponibles au niveau individuel (succès

d'éclosion, malformations embryonnaires) chez l'escargot terrestre *H. aspersa* en fin d'exposition (cf I.2.3.2). Cependant, la cinétique d'apparition des effets du Cd au cours du développement (effets précoces ou tardifs, cibles physiologiques...) au niveau individuel n'est pas connue de même, que la toxicité du Cd aux niveaux d'organisation cellulaire et moléculaire chez l'embryon d'*H. aspersa*.

I.6.2. Produits phytosanitaires

Les travaux de recherche ont été étendus à 3 pesticides classiquement utilisés dans le traitement de la vigne : un herbicide, le Round Up[®] Flash (450 g/L de glyphosate) ; 2 fongicides : le Corail[®] (250 g/L de tébuconazole) et la Bouillie Bordelaise (20% de Cuivre). L'embryotoxicité de ces 3 pesticides a été caractérisée chez les escargots au niveau individuel par Druart et al. (2010, 2012). Ces produits phytosanitaires ont donc été retenus pour approfondir l'étude des mécanismes impliqués dans leur toxicité aux échelles d'organisation infra-individuelles.

I.6.2.1. Le Round Up[®]

Le Round Up[®] (RU[®]) est un herbicide commercialisé depuis 1975 par la firme américaine Monsanto. Son principe actif est le glyphosate (à 450 g/L pour le RU[®] flash) auquel sont ajoutés des additifs appelés surfactants comme le polyoxyethylene amine (POEA) ainsi que des composés inertes (WHO, 1994). Le glyphosate est considéré comme modérément persistant : entre 2 à 140 jours suivant les types de sol (EC et ECB 2000). Son métabolite, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA), est par contre beaucoup plus persistant que la molécule mère avec un temps de dégradation compris entre 131 et 958 jours selon Monsanto (EC et ECB 2000). C'est un herbicide à large spectre, systémique et non sélectif. Ses caractéristiques ont conduit à une forte augmentation de son utilisation dans les zones agricoles et non agricoles dans le monde entier (WHO, 1994).

I.6.2.2. Le Corail[®]

Le Corail[®] est un fongicide de la famille des triazoles, utilisé lors du traitement de la vigne de façon préventive et curative. Il est utilisé pour le traitement de l'oïdium (parasite fongique), le rougeot parasitaire (ou Brenner) et le black-rot de la vigne (champignon phytopathogène). Son principe actif est le tébuconazole (250 g/L). Il est commercialisé par BAYER CropScience.

I.6.2.3. La Bouillie Bordelaise

La BB est un pesticide (algicide et fongicide) composé de sulfate de cuivre et de chaux. Elle est utilisée de façon préventive principalement contre le mildiou sur les arbres fruitiers (pêcher, pommier...), dans les jardins potager (pomme de terre, tomates...) et également sur la vigne. Elle est vendue sous forme de poudre de couleur bleue verdâtre composée de 20% de cuivre. Un agent mouillant est ajouté pour mettre la poudre en solution afin de pulvériser la BB sur les végétaux. Un usage répété de la BB conduit à une accumulation du Cu dans le sol parfois très forte (ex : 3200 mgCu/kg ; Mirlean et al., 2007).

I.6.2.4. Effets toxiques de ces 3 pesticides chez les embryons

Des effets toxiques des 3 pesticides cités ci-dessus sur la faune non-cible sont connus. Les paragraphes suivant présentent certains de ces effets.

- Round Up® et ses composés

Des effets embryotoxiques du RU® ont été rapportés chez des organismes aquatiques et terrestres (amphibiens). Les études s'intéressent souvent à l'effet du RU® mais aussi à ses différents composés.

Par exemple, Marc et al. (2002) ont démontré qu'une exposition à une solution de RU® contenant 8 mM de glyphosate affecte les cycles de division chez l'embryon d'oursin *S. granularis*. Chez cette même espèce, Marc et al. (2005) ont étudié l'effet de 4 formulations de pesticides contenant du glyphosate dont 2 types de RU® (RU® 3 plus à 170 g/L ; RU® Biovert 360 g/L). Des retards d'éclosion ont été démontrés dès 2 mM de glyphosate contenus dans le RU® 3 plus.

Chez les embryons de moules (*L. siliquioidea*) une EC_{50 48h} basée sur la survie à 2,9 mg/L a été estimée pour le RU® (Bringolf et al., 2007). Le glyphosate a été rapporté comme embryotoxique ce qui permet de supposer que la toxicité du RU® ne peut pas être attribuée seulement aux additifs. Chez l'huître (*C. gigas*) deux formulations ont été testées, le RU® Express (RU®_{EX}) et le RU® Allées et Terrasses (RU®_{AT}) ainsi que le glyphosate et l'AMPA seuls. Une EC₅₀ de 1133 µg/L basée sur le pourcentage de malformations après 48 heures d'exposition a été rapportée pour le RU®_{EX} contre 1675 µg/L pour le RU®_{AT}. Pour le glyphosate et l'AMPA seuls, les EC₅₀ rapportées sont respectivement de 27,1 et 46,1 µg/L (Mottier et al., 2013).

Chez les amphibiens, les embryons de salamandre (*Chioglossa lusitanica*) ont été exposés à la formulation commerciale du RU® plus (2,8 et 5,6 mg/L) ce qui a permis de

démontrer un effet positif du RU[®] sur la taille des jeunes éclos (Ortiz-Santaliestra et al., 2010).

Les travaux de Druart et al. (2010) via le LPB et les embryons d'*H. aspersa* ont montré que chez cette espèce le RU[®] est plus toxique que son principe actif le glyphosate (EC₅₀ de 18 mg/L pour le RU[®] et 1300 mg/L pour le glyphosate basé sur le taux d'éclosion). Les effets sur le développement embryonnaire du glyphosate et du RU[®] semblent apparaître tardivement au cours de l'embryogenèse avec des embryons bien développés mais n'arrivant pas à éclore.

Génotoxicité du RU[®]

La seule publication sur la génotoxicité du RU[®] chez des embryons concerne les reptiles. En effet, chez le caïman (*Caiman latirostris*), le MN et l'essai comète ont permis de mettre en évidence un effet génotoxique du RU[®] à partir de 500 µg/œufs (dommage à l'ADN) chez des érythrocytes d'embryons (Poletta et al., 2009).

- Corail[®] et Bouillie Bordelaise

Seuls les travaux de Druart et al. (2012) sur l'escargot petit-gris concernent des effets embryotoxiques du Corail[®] et de la BB chez des organismes terrestres. Une EC₅₀ proche de 0,1 mg/L de Corail[®] a été rapportée. Ce fongicide est le plus toxique des pesticides testés lors de cette étude avec des effets très prononcés dès l'application de faibles concentrations comparativement à la dose recommandée en application au champs (700 mg/L). Une EC₅₀ d'environ 8 g/L de BB (1,6 g/L de Cu) a été également déterminée, avec, encore une fois, la survenue d'un effet embryotoxique à des concentrations bien inférieures aux concentrations recommandées en application aux champs (38,2 g/L de BB).

Bilan de l'introduction

Embryotoxicité

- De nombreux paramètres de mesure des effets toxiques à différents niveaux d'organisation biologique sont disponibles à différents stades embryonnaires chez des organismes aquatiques.
- Peu de données sont disponibles afin de caractériser les effets toxiques des substances chimiques chez les stades embryonnaires d'organismes terrestres. Chez le gastéropode terrestre *Helix aspersa*, l'embryotoxicité du cadmium a été caractérisée en fin d'exposition par mesure des taux d'éclosion et la présence de malformations.
- **Aucune donnée n'est disponible sur la cinétique d'apparition des effets toxiques du Cd au cours du développement embryonnaire d'*H. aspersa* à différentes échelles d'organisation biologique.**

Génotoxicité

- Le test comète et le test des micronoyaux sont les deux méthodes les plus utilisées pour évaluer la génotoxicité en écotoxicologie. Cependant, elles semblent difficiles à mettre en œuvre sur un modèle embryonnaire.
- La méthode RAPD permet de détecter un large éventail de dommage à l'ADN induits par des substances variées au niveau de l'ensemble du génome d'un organisme.
- **Aucune donnée de génotoxicité n'est disponible chez l'embryon d'escargot petit-gris.**

Métallothionéines

- Les escargots terrestres adultes possèdent de fortes capacités d'accumulation et de détoxification des métaux. Plusieurs espèces sont capables de synthétiser des protéines appelées métallothionéines (MTs) qui sont impliquées dans la détoxification/séquestration des métaux non essentiels (Cd, Zn) ou dans l'homéostasie des métaux essentiels (Cu).
- Chez les adultes d'*Helix aspersa*, 3 isoformes des MTs ont été identifiées. Les séquences des gènes codant ces 3 protéines sont connues. Leur expression lors d'exposition au Cd ou au Cu a déjà fait l'objet d'études.
- **Chez les stades embryonnaires de l'escargot petit-gris, aucune donnée n'est disponible sur la présence de ces 3 isogènes. De plus, leur expression n'a pas été étudiée lors d'exposition à des contaminants métalliques.**

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer les réponses des embryons d'escargot induites à différents niveaux d'organisation biologique (individuel à moléculaire) par l'exposition à des contaminants variés et de rechercher des liens entre ces réponses. Trois objectifs principaux ont été fixés :

1/ Déterminer une batterie de paramètres détectables au cours de l'embryogenèse de l'escargot terrestre *Helix aspersa* afin de caractériser la cinétique d'apparition des effets toxiques du Cd à divers niveaux d'organisation. Ces travaux constituent le chapitre 1 de la partie Résultats de cette thèse. La recherche des critères de mesure est réalisée dans un premier temps lors d'expositions continues en phase liquide au Cd.

2/ Déterminer des signes d'éventuels effets génotoxiques de contaminants métalliques et organiques. Ces travaux constituent le chapitre 2 de la partie Résultats. Une première partie concerne la mise au point de la méthode RAPD sur les embryons d'escargot et l'optimisation de la phase d'analyse des profils pour la détection de signes de génotoxicité après exposition au Cd. La seconde partie s'intéresse à la détection de signes éventuels de génotoxicité de 3 pesticides : 2 organiques (le Round Up® et le Corail®), et 1 à base de métal, la Bouillie Bordelaise (20% de Cu) via la méthode mise au point avec le Cd.

3/ Déterminer si les embryons d'escargot possèdent des capacités de défense métal-spécifiques en identifiant les gènes codant pour les 3 MTs connues chez l'adulte *H. aspersa* et en étudiant leur expression suite à des expositions à des contaminants métalliques comme le Cd ou la Bouillie Bordelaise. L'influence de paramètres tels que l'âge des embryons au moment de l'exposition ou encore des modalités d'exposition (24h ou sur toute la durée de développement) a également été étudiée. Ces recherches font l'objet du chapitre 3 des Résultats.

I.7. Références bibliographiques

A

- Abel, J., Deruiter, N., 1989. Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol. Lett.* 47, 191–196.
- Ahmad, M.A., Gaur, R., Gupta, M., 2012. Comparative biochemical and RAPD analysis in two varieties of rice (*Oryza sativa*) under arsenic stress by using various biomarkers. *J. Hazard. Mater.* 217, 141–148.
- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 104–113.
- Aksakal, O., 2013. Assessment of paraquat genotoxicity on barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings using molecular and biochemical parameters. *Acta Physiol. Plant.* 35, 2281–2287.
- Aksakal, O., Erturk, F., Sunar, S., Bozari, S., Agar, G., 2013. Assessment of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis. *Ind. Crops Prod.* 42, 552–557.
- Al-Qurainy, F., Alameri, A.A., Khan, S., 2010. RAPD profile for the assessment of genotoxicity on a medicinal plant; *Eruca sativa*. *J. Med. Plants Res.* 4, 579–586.
- Ansaldo, M., Nahabedian, D.E., Di Fonzo, C., Wider, E.A., 2009. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1923–1928.
- Aras, S., Beyaztaş, T., Cansaran-Duman, D., Gökçe-Gündüzer, E., 2011. Evaluation of genotoxicity of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf by RAPD analysis. *Genet. Mol. Res.* 10, 3760–3770.
- Arslan, O.C., Parlak, H., 2007. Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology* 16, 439–444.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1993. Toxicological profile for cadmium: Update. U.S. Department of health and human services.
- ASTM E1439-98, 1998. Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX). ASTM International.
- ASTM E1563-98, 2004. Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos. ASTM International.
- ASTM STP1443, 2003. AMPHITOX: A Customized Set of Toxicity Tests Employing Amphibian Embryos. ASTM International.
- Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquat. Toxicol.* 50, 1–12.
- Atienzar, F.A., Cheung, V.V., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.* 59, 241–250.
- Atienzar, F.A., Billingham, Z., Depledge, M.H., 2002a. 4-n-Nonylphenol and 17- β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environ. Pollut.* 120, 735–738.
- Atienzar, F.A., Venier, P., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2002b. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 521, 151–163.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 125–140.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutat. Res.* 613, 76–102.
- Aydin, S.S., Basaran, E., Cansaran-Duman, D., Aras, S., 2013. Genotoxic effect of cadmium in okra seedlings: Comparative investigation with population parameters and molecular markers. *J. Environ. Biol.* 34, 985–990.
- Aydin, S.S., Gokce, E., Buyuk, I., Aras, S., 2012. Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 746, 49–55.

B

- Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., Skutkova, H., Provaznik, I., Hubalek, J., Kizek, R., 2012. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics* 4, 739–750.
- Bandow, C., Weltje, L., 2012. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci. Total Environ.* 435–436, 90–95.
- Barjhoux, I., Baudrimont, M., Morin, B., Landi, L., Gonzalez, P., Cachot, J., 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 272–282.
- Barker, G.M., 2001. The biology of terrestrial mollusks. Wallingford U.K, C.A.B International.
- Barky, F.A., Abdelsalam, H.A., Mahmoud, M.B., Hamdi, S.A.H., 2012. Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 9–18.
- Barsyte, D., White, K.N., Lovejoy, D.A., 1999. Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122, 287–296.
- Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1995. Induction of metallothionein synthesis in the gill and kidney of *Littorina Littorea* exposed to cadmium. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 75, 173–186.
- Bebianno, M.J., Langston, W.J., Simkiss, K., 1992. Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 72, 329–342.
- Becerril, C., Ferrero, M., Sanz, F., Castaño, A., 1999. Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. *Mutagenesis* 14, 449–456.
- Beker van Woudenberg, A., Wolterbeek, A., te Brake, L., Snel, C., Menke, A., Rubingh, C., de Groot, D., Kroese, D., 2013. A category approach to predicting the developmental (neuro) toxicity of organotin compounds: The value of the zebrafish (*Danio rerio*) embryotoxicity test (ZET). *Reprod. Toxicol.* 41, 35–44.
- Belpaeme, K., Cooreman, K., Kirsch-Volders, M., 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 415, 167–184.
- Ben Salah-Abbès, J., Abbès, S., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R., 2009. *Raphanus sativus* extract protects against Zearalenone induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice. *Toxicol.* 53, 525–533.
- Ben Salem, Z., Capelli, N., Grisey, E., Baurand, P.-E., Ayadi, H., Aleya, L., 2014. First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 90–96.
- Berger, B., Hunziker, P., Hauer, C., Birchler, N., Dallinger, R., 1995. Mass-spectrometry and amino-acid sequencing of 2 cadmium-binding metallothioneine isoforms from the terrestrial gastropod *Arianta arbustorum*. *Biochem. J.* 311, 951–957.
- Berger, B., Dallinger, R., Gehrig, P., Hunziker, P.E., 1997. Primary structure of a copper-binding metallothionein from mantle tissue of the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. *Biochem. J.* 328, 219–224.
- Bliefert, C., Perraud, R., 2001. Cadmium. *Chimie de l'environnement: air, eau, sols, déchets*. De Boeck Université, Paris, pp 386–388.
- Binz, P.-A., Kägi, J.H.R., 1999. Metallothionein: Molecular evolution and classification, in: Klaassen, C.D. (Ed.), *Metallothionein IV, Advances in Life Sciences*. Birkhäuser Basel, pp. 7–13.
- Bozari, S., Aksakal, O., 2013. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect genotoxic effect of trifluralin on maize (*Zea mays*). *Drug Chem. Toxicol.* 36, 163–169.
- Brasfield, S.M., Bradham, K., Wells, J.B., Talent, L.G., Lanno, R.P., Janz, D.M., 2004. Development of a terrestrial vertebrate model for assessing bioavailability of cadmium in the fence lizard (*Sceloporus undulatus*) and in ovo effects on hatchling size and thyroid function. *Chemosphere* 54, 1643–1651.
- Bringolf, R.B., Cope, W.G., Mosher, S., Barnhart, M.C., Shea, D., 2007. Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (unionidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2094–2100.

Buono, S., Manzo, S., Maria, G., Sansone, G., 2012. Toxic effects of pentachlorophenol, azinphos-methyl and chlorpyrifos on the development of *Paracentrotus lividus* embryos. *Ecotoxicology* 21, 688–697.

C

- Cachot, J., Law, M., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H., Winn, R., 2007. Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the lambda transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7830–7836.
- Cambier, S., Gonzalez, P., Durrieu, G., Bourdineaud, J.-P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 312–319.
- Cansaran-Duman, D., Atakol, O., Aras, S., 2011. Assessment of air pollution genotoxicity by RAPD in *Evernia prunastri* L. Ach. from around iron-steel factory in Karabük, Turkey. *J. Environ. Sci.* 23, 1171–1178.
- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Xiao, Z., Wang, Q., Dou, S., 2009. Cadmium toxicity to embryonic-larval development and survival in red sea bream *Pagrus major*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1966–1974.
- Carlsson, G., Norrgren, L., 2004. Synthetic musk toxicity to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 102–105.
- Carson, R., 1962. *Silent spring*. Boston, Mariner Books 400p.
- Castañó, A., Becerril, C., 2004. In vitro assessment of DNA damage after short and long-term exposure to benzo(a)pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 141–151.
- Cenkci, S., Yıldız, M., Cigerci, A., Konuk, M., Bozdag, A., 2009. Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere* 76, 900–906.
- Cenkci, S., Cigerci, İ.H., Yıldız, M., Ozay, C., Bozdag, A., Terzi, H., 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environ. Exp. Bot.* 67, 467–473.
- Cèsnienė, T., Kleizaite, V., Ursache, R., Zvingila, D., Radzevicius, A., Patamsyte, J., Rancelis, V., 2010. Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by *Tradescantia* bioassays. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 697, 10–18.
- Chabicoovsky, M., Niederstatter, H., Thaler, R., Hodl, E., Parson, W., Rossmanith, W., Dallinger, R., 2003. Localization and quantification of Cd and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190, 25–36.
- Chabicoovsky, M., Klepal, W., Dallinger, R., 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: Programmed cell death and metallothionein overload. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 648–655.
- Chang, C., Wu, S.L., Zhao, X.D., Zhao, C.T., Li, Y.H., 2014. Developmental toxicity of doxorubicin hydrochloride in embryo-larval stages of zebrafish. *Biomed. Mater. Eng.* 24, 909–916.
- Chen, W.-Y., John, J.A.C., Lin, C.-H., Lin, H.-F., Wu, S.-C., Lin, C.-H., Chang, C.-Y., 2004. Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 69, 215–227.
- Cheng, S.H., Kong Wai, A.W., So, C.H., Sun Wu, R.S., 2000. Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 3024–3031.
- Chevalier, L., Desbuquois, C., Le Lannic, J., Charrier, M., 2001. Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 324(11), 979–987.
- Coeurdassier, M., Gomot-De Vaufléury, A., Badot, P.-M., 2000. Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2571–2578.
- Coeurdassier, M., Saint-Denis, M., Gomot-De Vaufléury, A., Ribera, D., Badot, P.-M., 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 20, 1951–1957.

- Coeurdassier, M., Gomot-De Vaufléury, A., Lovy, C., Badot, P.-M., 2002a. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 425–431.
- Coeurdassier, M., Gomot-De Vaufléury, A., Saint-Denis, M., Ribera, D., Narbonne, J.F., Badot, P.-M., 2002b. Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 7, 138–150.
- Coeurdassier, M., Gomot-De Vaufléury, A., Badot, P.-M., 2003. Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 102–109.
- Commission of the European communities, 2006. Communication from the commission to the council, the European parliament, the European Economic and Social committee and the committee of the regions. Thematic Strategy for Soil Protection, 12.
- Cotelle, S., Féraud, J.F., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 246–255.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719.

D

- Dallinger, R., 2005. Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1185–R1195.
- Dallinger R., Wieser W., 1984. Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd, and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 79C(1), 125–129.
- Dallinger, R., Rainbow, P.S., 1993. Ecotoxicology of metals in invertebrates.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziger, P., Kgi, J.H.R., 1997. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature* 388, 237–238.
- Dallinger, R., Berger, B., Triebkorn-Köhler, R., Köhler, H., 2001. Soil biology and ecotoxicology, in: Barker, G.M. (Ed.), *The biology of terrestrial molluscs*. CABI, Wallingford, pp. 489–525.
- Dallinger, R., Lagg, B., Egg, M., Schipflinger, R., Chabicovsky, M., 2004. Cd accumulation and cd-metallothionein as a biomarker in *Cepaea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats. *Ecotoxicology* 13, 757–772.
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environ. Pollut.* 140, 492–499.
- Das, S., Khangarot, B.S., 2011. Bioaccumulation of copper and toxic effects on feeding, growth, fecundity and development of pond snail *Lymnaea luteola* L. *J. Hazard. Mater.* 185, 295–305.
- Dave, G., Xiu, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 126–134.
- Davies, W.J., Freeman, S.J., 1995. Frog Embryo Teratogenesis Assay, in: O'Hare, S., Atterwill, C.K. (Eds.), *In Vitro Toxicity Testing Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 311–316.
- De Vaufléury, A., Gimbert, F., Gomot, L., 2013. Bioaccumulation, bioamplification des polluants dans la faune terrestre - Un outil pour la biosurveillance des écosystèmes. EDP Sciences/ADEME (Ed.) 978-2-7598-0724-6. 682 p.
- De Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., Badot, P.-M., 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 797–806.
- De Wolf, H., Blust, R., Backeljau, T., 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 566, 249–262.
- Dégremont, C., Cachot, J., 2009. 2.2 La génotoxicité : quel risque pour les espèces aquatiques ? Fasc. Seine-Aval 2, p 4.
- Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R., Chidambaram, A.L.A., 2011. Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker. *C. R. Biol.* 334, 24–30.
- Doganlar, Z.B., 2012. Quizalofop-p-ethyl-induced phytotoxicity and genotoxicity in *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *J. Environ. Sci. Health Part A* 47, 1631–1643.

- Domingues, I., Oliveira, R., Musso, C., Cardoso, M., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2013. Prochloraz effects on biomarkers activity in zebrafish early life stages and adults. *Environ. Toxicol.* 28, 155–163.
- Downs, C.A., Dillon Jr., R.T., Fauth, J.E., Woodley, C.M., 2001. A molecular biomarker system for assessing the health of gastropods (*Ilyanassa obsoleta*) exposed to natural and anthropogenic stressors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259, 189–214.
- Druart C., 2011. Effets des pesticides de la vigne sur le cycle biologique de l'escargot dans divers contextes d'exposition. Thèse de l'Université de Franche-Comté, tel-00662413.
- Druart, C., Scheifler, R., de Vaufléury, A., 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *J. Hazard. Mater.* 184, 26–33.
- Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., de Vaufléury, A., 2012. Landsnail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. *Appl. Soil Ecol.* 53, 56–64.
- Ducrot, V., 2013. Mechanistic approaches for assessing effects of chemicals in aquatic molluscs. Habilitation à Diriger des Recherches. Université Rennes 1.

E

- EC (1986). Directive du Conseil (86/609/CEE) du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.
- EC (2002). Directive 2002/96/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on waste electrical and electronic equipment (WEEE).
- EC et ECB (2000). IUCLID Dataset Glyphosate. European Commission and European Chemicals Bureau. pdf: <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=ein>.
- EC (2003a). Technical Guidance Document on risk assessment. Part II. Institute for health and consumer protection.
- EC (2003b). Technical Guidance Document on risk assessment. Part III. Institute for health and consumer protection.
- EC (2004). Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, 2004-338.
- EC (2006). Regulation No 1907/2006 of The European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union* 49 (L396): 1-849.
- EC (2010). Directive 2010/63/EU du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. *Journal Officiel des Communautés européennes*.
- Egli, D., Yepiskoposyan, H., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Rajaram, R., Simons, A., Multhaup, G., Mettler, S., Vardanyan, A., Georgiev, O., Schaffner, W., 2006. A family knockout of all four *Drosophila* metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2286–2296.
- Eisler, R., 2000. Handbook of chemical risk assessment: Health hazards to humans, plants, and animals. Lewis Publishers, U. S., Boca Raton, FL.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Mazuy, C., Corbineau, F., Bailly, C., 2011. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. *J. Exp. Bot.* 62, 5003–5011.
- Enan, M.R., 2006. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43, 147–154.
- English, T.E., 2003. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Biol.* 206, 2517–2524.
- Erturk, F.A., Ay, H., Nardemir, G., Agar, G., 2013. Molecular determination of genotoxic effects of cobalt and nickel on maize (*Zea mays* L.) by RAPD and protein analyses. *Toxicol. Ind. Health* 29, 662–671.

F

- Fallahtafti, S., Rantanen, T., Brown, R.S., Snieckus, V., Hodson, P.V., 2012. Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 106–107, 56–64.
- Fathallah, S., Medhioub, M.N., Kraiem, M.M., 2012. Photo-induced toxicity of four polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to embryos and larvae of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 1001–1008.
- Fathallah, S., Medhioub, M.N., Kraiem, M.M., 2013. Combined toxicity of lead and cadmium on embryogenesis and early larval stages of the european clam *Ruditapes decussatus*. *Environ. Eng. Sci.* 30, 357–364.
- Filipič, M., 2012. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 733, 69–77.
- Fioroni, P., 1982. La résorption périphérique des albumines au cours de l'ontogénèse des gastéropodes pulmonés. Extrait du Bulletin de la société zoologique de France, Tome 7, 1, 87–100.
- Fol, H., 1879–1880 Studies on the molluscan development. Third memoir: On the development of pulmonate gastropods, *Arch. Zool. Exp. Gen.* 8, 102–232.
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1994. *Ecotoxicology in theory and practice*. Springer.
- Fourie, F., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 361–368.
- Fowler, B.A., Hildebrand, C.E., Kojima, Y., Webb, M., 1987. Nomenclature of metallothionein, in: Kägi, J.H.R., Kojima, Y. (Eds.), *Metallothionein II, Experientia Supplementum*. Birkhäuser Basel, pp. 19–22.
- Fritsch, C., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Crini, N., Scheifler, R., de Vaufléury, A., 2011. Investigations of responses to metal pollution in land snail populations (*Cantareus aspersus* and *Cepaea nemoralis*) from a smelter-impacted area. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 20, 739–759.

G

- Galindo, B., Troilo, G., Cólus, I., Martinez, C., Sofia, S., 2010. Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Water. Air Soil Pollut.* 212, 419–428.
- Garrett, S.H., Somji, S., Todd, J.H., Sens, D.A., 1998. Exposure of human proximal tubule cells to Cd^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} induces metallothionein protein accumulation but not metallothionein isoform 2 mRNA. *Environ. Health Perspect.* 106, 587–595.
- Garric, J., Morin, S., Vincent-Hubert, F., 2001. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. Des outils pour mesurer l'impact des toxiques sur l'écosystème aquatique 12. *Sciences Eaux & Territoires* 1, 12–17.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416.
- Geffard, O., Geffard, A., His, E., Budzinski, H., 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 481–490.
- Geffroy, B., Ladhar, C., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Brethes, D., Bourdineaud, J.-P., 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: The role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 6, 144–160.
- Gimbert, F., de Vaufléury, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Badot, P.-M., 2008. Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 138–146.
- Gimbert, F., de Vaufléury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P.-M., 2006. Modelling chronic exposure to contaminated soil: A toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environ. Int.* 32, 866–875.
- Gjorgieva, D., Kadifkova Panovska, T., Ruskovska, T., Bačeva, K., Stafilov, T., 2013. Influence of heavy metal stress on antioxidant status and DNA damage in *Urtica dioica*. *BioMed. Res. Int.* 2013, 1–6.

- Godet, E., Vasseur, B., Sabut, M., 1993. Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique. *Rev. Sci. Eau* 6, 285–314.
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D.A., 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* 1, 1–6.
- Gomot, A., 1997. Effects of heavy metals on the development of snails: Heavy metal pollution bioindicators for human health. *Bull. Acad. Natl. Med.* 181, 59–75.
- Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 288–297.
- Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix Aspersa*. An experimental study of the absorption route for the stimulating factors. *J. Molluscan Stud.* 55, 1–7.
- Gomot-De Vaufléury, A., Pihan, F., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 41–50.
- Guida, M., Guida, M., De Felice, B., Santafede, D., D'Alessandro, R., Di Spiezio Sardo, A., Scognamiglio, M., Ferrara, C., Bifulco, G., Nappi, C., 2010. Assessment of DNA damage by RAPD in *Paracentrotus lividus* embryos exposed to amniotic fluid from residents living close to waste landfill sites. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–8.
- Gupta, M., Sarin, N.B., 2009. Heavy metal induced DNA changes in aquatic macrophytes: Random amplified polymorphic DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker. *J. Environ. Sci. China* 21, 686–690.

H

- Habeebu, S.S., Liu, J., Klaassen, C.D., 1998. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 203–209.
- Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74, 205–217.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7–17.
- Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 378–388.
- Hamm, J.T., Hinton, D.E., 2000. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquat. Toxicol.* 48, 403–418.
- Herkovits, J., Perez-Coll, C.S., 2003. AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. ASTM special technical publication 1443, 46–62.
- Hermesen, S.A.B., Pronk, T.E., Brandhof, E.-J. van den Ven, L.T.M. van der Piersma, A.H., 2012. Concentration-response analysis of differential gene expression in the zebrafish embryotoxicity test following flusilazole exposure. *Toxicol. Sci.* 127, 303–312.
- Hispard, F., Schuler, D., de Vaufléury, A., Scheifler, R., Badot, P.-M., Dallinger, R., 2008a. Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1533–1542.
- Hispard, F., de Vaufléury, A., Martin, H., Devaux, S., Cosson, R.P., Scheifler, R., Richert, L., Berthelot, A., Badot, P.-M., 2008b. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 490–498.
- Höckner, M., Stefanon, K., de Vaufléury, A., Monteiro, F., Pérez-Rafael, S., Palacios, O., Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Physiological relevance and contribution to metal balance of specific and non-specific metallothionein isoforms in the garden snail, *Cantareus aspersus*. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 24, 1079–1092.
- Hoffman, D.J., Eastin, W.C. 1981. Effects of malathion, diazinon, and parathion on mallard embryo development and cholinesterase activity. *Environ. Res.* 26(2): 472–485.

Hwang, U.K., Park, J.S., Kwon, J.N., Heo, S., Oshima, Y., Kang, H.S., 2012. Effect of nickel on embryo development and expression of metallothionein gene in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). J. Fac. Agric. Kyushu Univ. 57, 145–149.

I

- IARC (1993) International Agency for Research on Cancer Monographs, vol 58, Cadmium, IARC Press, Lyon, pp 119–238.
- Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsiere, T., 2007. Anomalies chromosomiques de nombre, instabilité génétique et expositions professionnelles. Bull. Cancer (Paris) 94, 381–388.
- Ierusalimsky, V.N., Balaban, P.M., 2001. Ontogenesis of the snail, *Helix aspersa*: Embryogenesis timetable and ontogenesis of GABA-like immunoreactive neurons in the central nervous system. J. Neurocytol. 30, 73–91.
- Iglesias, J., Castillejo, J., Ester, A., Castro, R., Lombardia, M.J., 2002. Susceptibility of the eggs of the field slug *Deroceras reticulatum* to contact with pesticides and substances of biological origin on artificial soil. Ann. Appl. Biol. 140, 53–59.
- Ikediodi, C.O., Badisa, V.L., Ayuk-Takem, L.T., Latinwo, L.M., West, J., 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. Int. J. Mol. Med. 14, 87–92.
- Incardona, J.P., Swarts, T.L., Edmunds, R.C., Linbo, T.L., Aquilina-Beck, A., Sloan, C.A., Gardner, L.D., Block, B.A., Scholz, N.L., 2013. Exxon Valdez to deepwater horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. Aquat. Toxicol. 142–143, 303–316.
- ISO 12890:1999. Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish – Semi-static method. Water quality.
- ISO 15952:2006. Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helicidae) – Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol. Qualité du sol.
- ISO 15088:2007. Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). Water quality.
- Itziou, A., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2011a. Effects of organic contaminants in reactive oxygen species, protein carbonylation and DNA damage on digestive gland and haemolymph of land snails. Chemosphere 85, 1101–1107.
- Itziou, A., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2011b. In vivo and in vitro effects of metals in reactive oxygen species production, protein carbonylation, and DNA damage in land snails *Eobania vermiculata*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60, 697–707.
- Izquierdo, J.I., Machado, G., Ayllon, F., d'Amico, V.L., Bala, L.O., Vallarino, E., Elias, R., Garcia-Vazquez, E., 2003. Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 24–29.

J

- Jeffrey, A.M., Williams, G.M., 2005. Risk assessment of DNA-reactive carcinogens in food. Toxicol. Appl. Pharmacol. 207, 628–635.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. Mutagenesis 23, 207–221.

K

- Kägi, J.H.R., Schäffer, A., 1988. Biochemistry of metallothionein. Biochemistry (Mosc.) 27, 8509–8515.
- Kägi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. Methods Enzymol. 205, 613–626.
- Kang, Y.J., 1999. The antioxidant function of metallothionein in the heart. Exp. Biol. Med. 222, 263–273.
- Kecec, G., Tombuloglu, H., Sakcali, M.S., Uzonur, I., 2009. Determination of boron genotoxicity on maize (*Zea mays* L.) by using RAPD analysis and mitotic activity. New Biotechnol. 25, Supplement, S302.

- Kekec, G., Sakcali, M.S., Uzonur, I., 2010. Assessment of genotoxic effects of boron on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using RAPD analysis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84, 759–764.
- Kerney, M., Cameron, R.A.D., 2006. A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe, French ed. Delachaux et Niestlé SA, Paris.
- Khangarot, B.S., Das, S., 2010. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. *J. Hazard. Mater.* 179, 665–675.
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Looock, K.V., Decordier, I., 2011. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 85, 873–899.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 215–220.
- Korpe, D.A., Aras, S., 2011. Evaluation of copper-induced stress on eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings at the molecular and population levels by use of various biomarkers. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 719, 29–34.
- Krumschnabel, G., Ebner, H.L., Hess, M.W., Villunger, A., 2010. Apoptosis and necroptosis are induced in rainbow trout cell lines exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 99, 73–85.

L

- Lalah, J.O., Severin, G.F., Schramm, K.-W., Lenoir, D., Behechti, A., Guenther, K., Kettrup, A., 2006. Effects of a branched p-nonylphenol isomer (4(3',6'-dimethyl-3'-heptyl)-phenol) on embryogenesis in *Lymnaea stagnalis* L. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 104–112.
- Lecalve, D., 1989. Influence of incubations conditions of eggs on the 1st 6 weeks of the growth of snails *Helix aspersa* Muller (gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). *Bull. Soc. Zool. Fr. Evol. Zool.* 114, 101–110.
- Lee, S., Chung, H., Kim, S., Lee, I., 2013. The genotoxic effect of ZnO and CuO nanoparticles on early growth of buckwheat, *Fagopyrum Esculentum*. *Water. Air Soil Pollut.* 224, 1–11.
- Leffa, D.D., Damiani, A.P., da Silva, J., Zocche, J.J., dos Santos, C.E.I., Boufleur, L.A., Dias, J.F., de Andrade, V.M., 2010. Evaluation of the genotoxic potential of the mineral coal tailings through the *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 614–621.
- Lerebours, A., Cambier, S., Hislop, L., Adam-Guillermine, C., Bourdineaud, J.-P., 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 755, 55–60.
- Leung, K.M.Y., Grist, E.P.M., Morley, N.J., Morritt, D., Crane, M., 2007. Chronic toxicity of tributyltin to development and reproduction of the European freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Chemosphere* 66, 1358–1366.
- Libralato, G., Minetto, D., Totaro, S., Mičetić, I., Pigozzo, A., Sabbioni, E., Marcomini, A., Volpi Ghirardini, A., 2013. Embryotoxicity of TiO₂ nanoparticles to *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). *Mar. Environ. Res.* 92, 71–78.
- Lilja, K., Prevodnik, A., Gardeström, J., Elfving, T., Tedengren, M., Bollner, T., 2008. Regional differences in mRNA responses in blue mussels within the Baltic proper. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 148, 101–106.
- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P., Sun, T., 2007. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere* 67, 1155–1163.
- Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Xie, L.J., Han, Y.P., 2009. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *J. Hazard. Mater.* 161, 878–883.
- Liu, W., Sun, L., Zhong, M., Zhou, Q., Gong, Z., Li, P., Tai, P., Li, X., 2012. Cadmium-induced DNA damage and mutations in *Arabidopsis* plantlet shoots identified by DNA fingerprinting. *Chemosphere* 89, 1048–1055.
- Lutz, H., Lutz-Ostertag, Y., 1973. Pesticides, tératogénèse et survie chez les oiseaux. *Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. Exp.* 56, 65–78.

M

- Ma, Y., Wu, M., Li, D., Li, X., Li, P., Zhao, J., Luo, M., Guo, C., Gao, X., Lu, C., Ma, X., 2012. Embryonic developmental toxicity of selenite in zebrafish (*Danio rerio*) and prevention with folic acid. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2854–2863.
- Mahrous, K.F., Khalil, W.K.B., Mahmoud, M.A., 2006. Assessment of toxicity and clastogenicity of sterigmatocystin in Egyptian Nile tilapia. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 1180–1189.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670.
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., Cachot, J., 2013. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1–8.
- Mamindy-Pajany, Y., Hurel, C., G  ret, F., Galgani, F., Battaglia-Brunet, F., Marmier, N., Rom  o, M., 2013. Arsenic in marine sediments from French Mediterranean ports: Geochemical partitioning, bioavailability and ecotoxicology. *Chemosphere* 90, 2730–2736.
- Marasco, F., Murciano, C., 2003. Les escargots. Editions de Vecchi, Paris.
- Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Bell  , R., Mulner-Lorillon, O., 2005. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 1–8.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G., Bell  , R., 2002. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 326–331.
- Margoshes, M., Vallee, B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Am. Chem. Soc.* 79, 1768–1777.
- Mat, A.M., Haberkorn, H., Bourdineaud, J.-P., Massabuau, J.-C., Tran, D., 2013. Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquat. Toxicol.* 140–141, 458–465.
- Meistertzheim, A.-L., Lejart, M., Le Go  c, N., Th  bault, M.-T., 2009. Sex, gametogenesis, and tidal height-related differences in levels of HSP70 and metallothioneins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 152, 234–239.
- Metcalf, T.L., Dillon, P.J., Metcalfe, C.D., 2008. Effects of formulations of the fungicide, pentachloronitrobenzene on early life stage development of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 71, 1957–1962.
- Mhadhbi, L., Beiras, R., 2012. Acute toxicity of seven selected pesticides (alachlor, atrazine, dieldrin, diuron, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon) to the marine fish (turbot, *Psetta maxima*). *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 5917–5930.
- Mirlean, N., Roisenberg, A., Chies, J.O., 2007. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environ. Pollut.* 149, 10–17.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Garnayak, S.K., Dutta, S.K., 2009. PCR based detection of furadan genotoxicity effects in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. *Vet. Res. Commun.* 33, 771–780.
- Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2235–2242.
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128–129, 67–78.
- Mu, J., Wang, X., Jin, F., Wang, J., Hong, H., 2012. The role of cytochrome P4501A activity inhibition in three to five-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons embryotoxicity of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1445–1451.

N

- Nan, P., Xia, X., Du, Q., Chen, J., Wu, X., Chang, Z., 2013. Genotoxic effects of 8-hydroxyquinoline in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) assessed by the micronucleus test, comet assay and RAPD analysis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35, 434–443.

Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159, 100–107.

O

- OECD, 1997. Essai n°474 : Le test de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2010. Essai n°487 : Essai in vitro de micronoyaux sur cellules de mammifères, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, OECD Publishing.
- OECD, 2013. Essai n°236 : Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Olive, P.L., Banáth, J.P., 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1, 23–29.
- Olive, P.L., Trotter, T., Banáth, J.P., Jackson, S.M., Le Riche, J., 1996. Heterogeneity in human tumour hypoxic fraction using the comet assay. *Br. J. Cancer. Suppl.* 27, S191–S195.
- Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Coelho, D.R., De-Carvalho, R.R., Paumgarten, F.J.R., 2010. Comparative toxicity of *Euphorbia milii latex* and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere* 81, 218–227.
- Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Grisolia, C.K., Paumgarten, F.J.R., 2005. Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 1185–1190.
- Olsson, P.-E., Zafarullah, M., Foster, R., Hamor, T., Gedamu, L., 1990. Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.* 193, 229–235.
- Orieux, N., Cambier, S., Gonzalez, P., Morin, B., Adam, C., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.-P., 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 974–983.
- Orrego, R., Guchardi, J., Beyger, L., Krause, R., Holdway, D., 2011. Comparative embryotoxicity of pulp mill extracts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American flagfish (*Jordanella floridae*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 104, 299–307.
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, C., Iarmarcovai, G., Botta, A., 2005. De la génotoxicologie à la biosurveillance. Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, Annales 28, 25–28.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Fernández-Benítez, M.J., Lizana, M., Marco, A., 2010. Influence of a combination of agricultural chemicals on embryos of the endangered gold-striped salamander (*Chioglossa lusitanica*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 672–680.
- Osterauer, R., Fassbender, C., Braunbeck, T., Koehler, H.-R., 2011. Genotoxicity of platinum in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*). *Sci. Total Environ.* 409, 2114–2119.
- Ozakca, D.U., Silah, H., 2013. Genotoxicity effects of flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107, 38–43.
- Özlem, Ç.A., Hatice, P., 2008. Effects of bisphenol A on the embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Environ. Toxicol.* 23, 387–392.

P

- Palacios, Ò., Pagani, A., Pérez-Rafael, S., Egg, M., Höckner, M., Brandstätter, A., Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Shaping mechanisms of metal specificity in a family of metazoan metallothioneins: evolutionary differentiation of mollusc metallothioneins. *BMC Biol.* 9, 4.
- Pérez-Rafael, S., Mezger, A., Lieb, B., Dallinger, R., Capdevila, M., Palacios, Ò., Atrian, S., 2012. The metal binding abilities of *Megathura crenulata* metallothionein (McMT) in the frame of Gastropoda MTs. *J. Inorg. Biochem.* 108, 84–90.
- Perina, F.C., Souza Abessa, D.M., Pinho, G.L.L., Fillmann, G., 2011. Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. *Ecotoxicology* 20, 1870–1880.

- Pietroock, M., Meinelt, T., Marcogliese, D.J., 2008. Effects of cadmium exposure on embryogenesis of *Stagnicola elodes* (Mollusca, Gastropoda): Potential consequences for parasite transmission. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 43–48.
- Pinsino, A., Matranga, V., Trinchella, F., Roccheri, M.C., 2010. Sea urchin embryos as an in vivo model for the assessment of manganese toxicity: developmental and stress response effects. *Ecotoxicology* 19, 555–562.
- Plaire, D., Bourdineaud, J.-P., Alonzo, A., Camilleri, V., Garcia-Sanchez, L., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2013. Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 158, 231–243.
- Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D., 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 672, 95–102.
- Prodan, L., 1932. Cadmium poisoning: II. Experimental cadmium poisoning. *J. Ind. Hyg.* 14, 174–196.

R

- Ragusa, M.A., Costa, S., Gianguzza, M., Roccheri, M.C., Gianguzza, F., 2012. Effects of cadmium exposure on sea urchin development assessed by SSH and RT-qPCR: metallothionein genes and their differential induction. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2157–2167.
- Ramade, F., 2000. Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Édiscience International, Paris, France, 690 p.
- Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie : fondements et applications. Lavoisier, Lassay-les-Châteaux.
- Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F., 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: An integrated approach. *Environ. Health Perspect.* 114, 63–69.
- Rigaud, C., Couillard, C.M., Pellerin, J., Légaré, B., Gonzalez, P., Hodson, P.V., 2013. Relative potency of PCB126 to TCDD for sublethal embryotoxicity in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 128–129, 203–214.
- Roccheri, M.C., Agnello, M., Bonaventura, R., Matranga, V., 2004. Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 80–87.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V., 2010. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1530–1536.
- Rocco, L., Izzo, A., Zito, G., Peluso, C., 2011. Genotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to two pharmacological products from an impacted Italian river. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 1, 103.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Zito, G., Archimandritis, A., Peluso, C., Stingo, V., 2012. Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants. *Environ. Toxicol.* 27, 18–25.
- Rocha, C.A.M. da, 2011. The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: A brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulphate. *Middle-East J. Sci. Res.* 8, 23–29.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Fuentes, M.E., 1995. Cadmium-induced expression of metallothionein and suppression of RNA to DNA ratios during molluscan development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 130–138.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E., 1996. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusk *Crassostrea virginica*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 356–363.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E., 1997. Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aquat. Toxicol.* 39, 185–194.
- Russo, R., Zito, F., Matranga, V., 2013. Tissue-specificity and phylogenetics of PI-MT mRNA during *Paracentrotus lividus* embryogenesis. *Gene* 519, 305–310.

S

- Sánchez-Argüello, P., Aparicio, N., Fernández, C., 2012. Linking embryo toxicity with genotoxic responses in the freshwater snail *Physa acuta*: Single exposure to benzo(a)pyrene, fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with benzo(a)pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80, 152–160.
- Saotome, K., Sofuni, T., Hayashi, M., 1999. A micronucleus assay in sea urchin embryos. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 446, 121–127.
- Sarkar, T., Vijay Anand, K.G., Reddy, M.P., 2010. Effect of nickel on regeneration in *Jatropha curcas* L. and assessment of genotoxicity using RAPD markers. *BioMetals* 23, 1149–1158.
- Scheifler, R., 2002. Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques et organiques dans des réseaux trophiques "sols - plantes - invertébrés". Thèse de l'Université de Franche-Comté, n°916.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufléury, A., Badot, P.-M., 2002a. Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: Bioaccumulation and effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 148–153.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufléury, A., Toussaint, M.L., Badot, P.-M., 2002b. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48, 571–579.
- Scheifler, R., Ben Brahim, M., Gomot-de Vaufléury, A., Carnus, J.-M., Badot, P.-M., 2003. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environ. Pollut.* 122, 343–350.
- Scheifler, R., de Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Crini, N., Badot, P.-M., 2006. Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 815–822.
- Schirling, M., Bohlen, A., Triebskorn, R., Köhler, H.-R., 2006. An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. *Chemosphere* 64, 1730–1738.
- Schuler, D., Dallinger, R., Hispard, F., De Vaufléury, A., 2008. Biochemical characterization of metallothionein isoforms in terrestrial snails: Relationship between amino acid sequence and metal binding specificity. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 151, S20.
- Schutze, G., Becker, R., Dammgen, U., Nagel, D., Schlutow, A., Weigel, J., 2003. Assessment of risks to human health and the environment from cadmium in fertilisers. *Landbauforschung Volkenrode* 53, 63–170.
- Schnurstein, A., Braunbeck, T., 2001. Tail moment versus tail length-application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 187–196.
- Selderslaghs, I.W.T., Blust, R., Witters, H.E., 2012. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reprod. Toxicol.* 33, 142–154.
- Shoaib, M.A., Mahmoud, M.F., Loutfy, N., Tawfic, M.A., Barta, M., 2010. Effect of botanical insecticide Nimbecidine® on food consumption and egg hatchability of the terrestrial snail *Monacha obstructa*. *J. Pest. Sci.* 83, 27–32.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Sunar, S., Yildirim, N., Aksakal, O., Agar, G., 2012. Determination of the genotoxic effects of *Convolvulus arvensis* extracts on corn (*Zea mays* L.) seeds. *Toxicol. Ind. Health* 29, 449–459.
- Swaileh, K.M., Hussein, R., Ezzughayyar, A., 2007. Evaluating wastewater-induced plant genotoxicity using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Environ. Toxicol.* 23, 117–122.

T

- Taspinar, M.S., Agar, G., Yildirim, N., Sunar, S., Aksakal, O., Bozari, S., 2009. Evaluation of selenium effect on cadmium genotoxicity in *Vicia faba* using RAPD. *J. Food Agric. Environ.* 7, 857–860.

- Teixidó, E., Piqué, E., Gómez-Catalán, J., Llobet, J.M., 2013. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicol. In Vitro* 27, 469–478.
- Theodorakis, C.W., Bickham, J.W., Lamb, T., Medica, P.A., Lyne, T.B., 2001. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada Test Site, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 317–326.
- Thornalley, P.J., Vasák, M., 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 827, 36–44.
- Tuney, I., Unal, D., Sukatar, A., 2007. Effects of external polyamines on DNA under the highest copper toxicity in *Ulva lactuca* L. and genotoxicity detection by RAPD-PCR assay. *Fresenius Environ. Bull.* 16, 1667–1670.

V

- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., Atienzar, F., Rodius, F., Lemièrre, S., 2008. Marqueurs de génotoxicité et effets in situ, individuels et populationnels dans Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Edition TEC & DOC.
- Velisek, J., Stara, A., Machova, J., Dvorak, P., Zuskova, E., Prokes, M., Svobodova, Z., 2012. Effect of terbutryn at environmental concentrations on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 102, 102–108.
- Vincent-Hubert, F., Arini, A., Gourlay-Francé, C., 2011. Early genotoxic effects in gill cells and haemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, B[a]P and a combination of B[a]P and Cd. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 723, 26–35.

W

- Waalkes, M.P., 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* 79, 241–244.
- Weisbrod, A.V., Sahi, J., Segner, H., James, M.O., Nichols, J., Schultz, I., Erhardt, S., Cowan-Ellsberry, C., Bonnell, M., Hoeger, B., 2008. The state of in vitro science for use in bioaccumulation assessments for fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 86–96.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 85, 133–142.
- WHO (World Health Organization), 1994. Glyphosate. Environmental Health Criteria 159, Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>
- WHO (World Health Organization), 1992. Environmental Health Criteria 134 - Cadmium International Program on Chemical Safety (IPCS) Monograph.
- Wolff, E., 1936. Les bases de la tératogénèse expérimentale des vertébrés amniotes, d'après les résultats de méthodes directes. Les Éditions de la Librairie Union, Strasbourg, France, 375 p.

X

- XP T90-382, 2009. Bio indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux. Détermination de la toxicité potentielle d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de bivalve. Qualité de l'eau. AFNOR, Paris.

Z

- Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 96–103.
- Zhou, J., Cai, Z.-H., Xing, K.-Z., 2011. Potential mechanisms of phthalate ester embryotoxicity in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Environ. Pollut.* 159, 1114–1122.

PARTIE II. Matériels et Méthodes

II.1. Conditions d'élevage des escargots en laboratoire et obtention des pontes

L'élevage des escargots est maîtrisé en laboratoire (Gomot et Deray, 1987 ; Gomot, 1997 ; Gomot de Vaufleury, 2000 ; ISO 15952:2006). Les escargots matures pour la reproduction proviennent de l'élevage interne du laboratoire en parc extérieur de mai à octobre puis ils sont utilisés, selon leur date de récolte, soit directement pour obtenir des pontes, soit après quelques mois d'hibernation (ISO 15952:2006).

Les adultes reproducteurs sont placés dans des cages (40 individus par m²) dans une salle régulée avec une photopériode de 18 heures de lumière par jour, une température de 20°C et une humidité d'environ 80% (Figure II-1).



Figure II-1 : Salle et cages d'élevage des escargots en conditions contrôlées

Les cages sont nettoyées 3 fois par semaine. Les adultes sont nourris avec un aliment pour escargots *Helixal*[®] *unique* (SAS Antigny Nutrition, 85510 Le Boupere). Une semaine à 10 jours après avoir observé des accouplements, des pots de ponte (récipients en verre remplis de terreau horticole SEM support de culture NF 44-551, avec engrais ; 82% de matière organique, pH : 6,5) sont placés dans les cellules du dispositif d'élevage en fin de journée. Le lendemain matin, les escargots en cours de ponte (Figure II-2) sont isolés. Une fois la ponte terminée, l'escargot est replacé dans sa cellule et les œufs sont nettoyés à l'aide d'une passoire dans une bassine d'eau à 20°C afin de retirer le maximum de particules de terreau. Ils sont ensuite comptés et déposés dans une boîte de Pétri (Stérilin, 90 x 14,2 mm, polystyrène cristal, 3 ergots) contenant du papier Whatman humidifié (grade I, diamètre 90 mm) jusqu'à leur utilisation ou leur éclosion.

Ces boîtes sont placées en chambre d'incubation dans des conditions identiques à celles de la salle d'élevage.



Figure II-2 : Escargot *Helix aspersa* en cours de ponte et ponte avant nettoyage
(d'après Druart et al. 2010)

II.2. Systèmes et modalités d'expositions des oeufs

II.2.1. Dispositif d'exposition

Le bioessai en phase liquide (LPB - *Liquide Phase Bioessai*) mis au point par Druart et al. (2010, 2012) a été utilisé pour toutes les expositions aux substances chimiques réalisées au cours de ce travail de thèse. Une fois nettoyés, les oeufs sont exposés dès les premiers stades de l'embryogenèse 12 à 24h maximum après la fin de la ponte. Généralement 3 à 5 pontes (réplicats) par essai sont utilisées. Les œufs d'une même ponte sont déposés à raison de 10 par réplikat, dans des boîtes de Pétri (Greiner Bio-one, 35 x 10 mm, polystyrène cristal, 3 ergots), dont le fond est recouvert par 4 papiers filtres (Whatman grade 1 ; 32 mm de diamètre). Les papiers filtres sont ensuite imbibés de 0,8 mL de solution à tester ou d'eau déminéralisée pour la modalité témoin (Figure II-3).

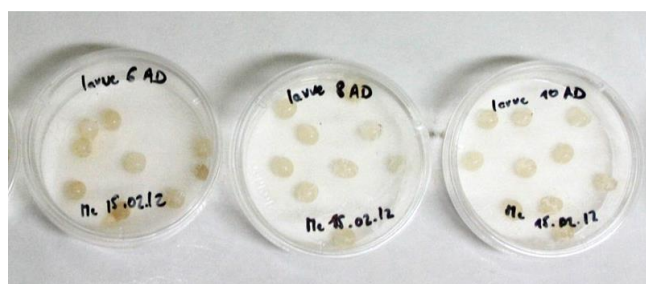


Figure II-3: Dispositif d'exposition utilisant les œufs d'*Helix aspersa*

Les solutions d'exposition sont réalisées à partir de chlorure de cadmium solide (CdCl_2 , Sigma chemical, 99,99%), de poudre de Bouillie Bordelaise RSR Disperss (20% de Cu, Cerexagri), ou de solution commerciale de Round Up[®] flash (glyphosate 450 g/L, Monsanto) ou Corail[®] (tébuconazole 250 g/L, Bayer Cropsciences). Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau déminéralisée qui sert également de solution témoin. Les concentrations réelles des solutions de Cd et de Cu ont été mesurées par ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy*).

En fin d'exposition, généralement après 20 jours afin de prendre en compte les éventuels retards d'éclosion chez les œufs/embryons exposés aux contaminants, le pourcentage d'éclosion est déterminé ainsi que les paramètres écotoxicologiques courants, comme les Concentrations Efficaces inhibant 10 et 50% du succès d'éclosion (CE_{10} et CE_{50}).

II.2.2. Modalités d'exposition

Pendant les expériences réalisées au cours de cette thèse, deux modalités d'exposition ont été utilisées.

II.2.2.1. Exposition continue

Cette 1^{ère} modalité permet d'étudier les effets d'une exposition telle qu'elle peut se produire en milieu naturel quand l'humidité du sol est constante et que la solution du sol présente une concentration stable d'un contaminant non dégradabile (métaux par exemple). Pour les molécules organiques moins rémanentes, ce scénario permet de prendre en compte leur dégradation dans le milieu au cours de l'exposition. En exposition continue, les œufs sont incubés dans des boîtes de Pétri dont le fond est recouvert de papiers filtres imbibés de solutions contaminées sans renouvellement des papiers filtres au cours du bioessai. Le jour d'exposition au contaminant est appelé jour 0.

II.2.2.2. Exposition durant 24 heures

Ce type de scénario mime une exposition se déroulant en milieu naturel avec une période d'exposition puis un lessivage des contaminants après une pluie par exemple. Dans ce scénario, la durée de l'exposition aux contaminants est fixe (24 h). Après cette étape, les œufs sont transférés sur du papier humidifié non contaminé.

Ce type d'exposition a été utilisé afin d'étudier la régulation des gènes des *MTs* chez les embryons qui ont été exposés à deux stades : 0 et 6 jours (Figure II-4). Après la fin de la ponte les œufs sont rapidement séparés en 2 groupes. Une partie est incubée avec les contaminants pour une durée de 24 heures (du jour 0 au jour 1) puis les œufs sont placés en conditions témoins jusqu'à l'éclosion (J1 à J20). Le reste de la ponte est incubée en conditions

témoins (0,8 mL d'eau osmosée) jusqu'au 6^{ème} jour de développement (début du stade larvaire) avant d'être exposé pendant 24 heures, c'est-à-dire jusqu'au jour 7. Les œufs sont ensuite incubés en conditions témoins jusqu'à l'éclosion (J7 à J20).

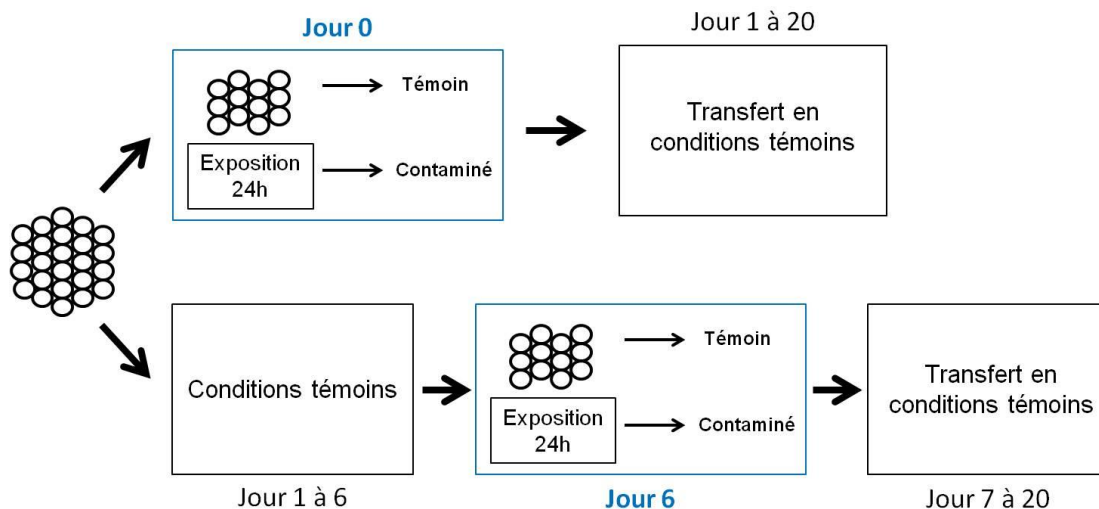


Figure II-4 : Scénario d'exposition de courte durée (24 heures)

II.3. Prélèvements des œufs/embryons

Les œufs, exposés ou non, ont été utilisés pour plusieurs manipulations : dosage du Cd, suivi du développement, extractions d'acides nucléiques (ADN et ARN). Hormis pour les dosages de Cd, les œufs ont été disséqués afin d'observer le stade de développement de l'embryon et/ou de le prélever.

II.3.1. Dosage des concentrations en cadmium dans les œufs

Les dosages ont été effectués dans des œufs entiers exposés à des concentrations en Cd de 40 µg/L, 4 ou 6 mg/L. Ces mesures ont été réalisées par ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry*), sur des groupes de 5 œufs afin d'être au-delà des limites de quantification du spectromètre de masse.

Pour l'exposition continue, les œufs ont été prélevés à J0, J3, J6, J10, J12, J15 et J20. Lors des expositions de 24 heures, les œufs ont été prélevés à J1, J6, J12 et J15 pour les exposés au jour 0 et à J7, J12 et J15 pour les exposés au jour 6.

II.3.2. Suivi des paramètres de développement

Les travaux sur le suivi de ces paramètres pendant une exposition à 6 mg/L de Cd font l'objet du chapitre 1 de la partie Résultats de cette thèse. Le paragraphe suivant résume les critères de mesure utilisés.

Afin de suivre les paramètres relatifs au développement embryonnaire lors des expositions continues, les œufs sont tout d'abord disséqués. Leur coque calcaire est ouverte à l'aide d'un cutter puis retirée à l'aide d'une paire de pinces de dissection. Les embryons dans l'albumen sont ensuite observés sous microscope.

En exposition continue à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd et à 0,5 g/L de Cu (2,5 g/L de BB), différents paramètres ont été suivis comme la taille des embryons après 3, 6 et 10 jours d'exposition. Les battements cardiaques ont été mesurés à J7. Les délais d'éclosion et les malformations des œufs non éclos ont été déterminés de J15 à J20. Enfin, la masse fraîche des jeunes éclos a été relevée.

II.3.3. Dissection des oeufs pour les analyses moléculaires

Les différentes extractions d'acides nucléiques ont été réalisées sur des embryons en cours (âgés de moins de 12 jours) ou en fin de développement ou (âgés de 20 jours). Une étape délicate de dissection a été nécessaire concernant les oeufs afin de retirer la coque calcaire sans percer l'albumen et de pouvoir extraire l'embryon de l'albumen. Cette dernière étape étant primordiale pour éviter le surplus d'albumen qui peut colmater les colonnes d'extraction d'acides nucléiques. Les embryons âgés de moins de 6 jours ont été extraits de l'albumen à l'aide d'une micropipette. Pour les embryons plus âgés, les prélèvements ont été réalisés à l'aide de 2 paires de pinces de dissection préalablement stérilisées.

II.4. Etude de la génotoxicité des contaminants

II.4.1. Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir d'embryons en cours de développement (depuis J1) jusqu'aux jeunes éclos (J20). Pour les embryons âgés de moins de 7 jours, les faibles quantités de matériel biologique (MF < 10 mg) ont nécessité l'emploi du kit d'extraction QIAamp® DNA Micro (Qiagen, Hilden, Germany). Pour les embryons les plus développés (âge > 7 jours) le kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) a été utilisé.

Les protocoles suivis sont ceux proposés dans les kits pour des extractions réalisées à partir de tissus animaux. Quelques étapes ont dû être optimisées pour obtenir des rendements et des qualités d'extraction suffisants pour les études post-extraction.

II.4.1.1. Embryons jusqu'à 7 jours de développement

Pour les embryons de moins de 7 jours le protocole du kit QIAamp[®] DNA Micro a été suivi avec quelques modifications. Afin d'obtenir des quantités suffisantes d'ADN, des nombres d'embryon différents ont été utilisés en fonction de leur stade de développement :

- 15 embryons de 0 à 1 jour
- 10 embryons de 2 à 3 jours
- 5 embryons de 4 à 5 jours
- 3 embryons de 6 à 7 jours

Après 15 sec d'homogénéisation (vortex) en présence de 180 µL de tampon de lyse et 20 µL de Protéinase K, les embryons sont incubés à 56°C pendant des durées variables afin d'optimiser la lyse des tissus:

- Embryons de 0 à 1 jour → 30 min
- Embryons de 2 à 3 jours → 45 min
- Embryons de 4 à 5 jours → 1 heure
- Embryon de 6 à 7 jours → 2 heures

Ensuite, les embryons sont une nouvelle fois homogénéisés durant 15 sec. Les ARNs sont dégradés après une incubation de 30 min à 37°C avec 1 µL de RNase A (100 mg/mL). La dernière étape de lyse est réalisée par ajout de 200 µL de tampon AL. Après homogénéisation des échantillons, 200 µL d'éthanol (96 – 100 %) froid (4°C) sont ajoutés. Les échantillons sont incubés 5 min à température ambiante. La totalité du mélange obtenu est transférée dans une colonne Dneasy Mini spin puis le tout est centrifugé 75 sec à 10 000 rpm. 500 µL de tampon de lavage sont ajoutés dans chaque colonne avant une nouvelle centrifugation (75 sec à 10 000 rpm). Un second lavage est réalisé avec 500 µL de tampon. Les colonnes sont ensuite séchées lors de 2 centrifugations successives (2 min à 14 500 rpm). L'élution de l'ADN est réalisée en 2 temps par ajout de 30 µL de tampon d'élution au centre de la colonne. Les échantillons sont incubés 5 min à température ambiante puis centrifugés 1 min à 14 500 rpm afin de récupérer l'ADN fixé sur la résine. La seconde partie de l'élution s'effectue avec 15 µL de tampon. Après élution, les échantillons sont conservés à -20°C.

II.4.1.2. Embryons au-delà de 7 jours de développement

Les quantités de matériel biologique de départ étant plus importantes, seuls 3 escargots sont regroupés pour former un échantillon dont la masse fraîche est comprise entre 15 et 30 mg. Un maximum de coquille des jeunes éclos est retirée afin d'éviter le colmatage des colonnes fixatrices d'ADN. Les mêmes volumes de tampon de lyse tissulaire et de protéinase

K que précédemment sont utilisés. Cependant, la lyse s'effectue sur une nuit. Le lendemain, les tubes sont centrifugés 2 min à 14 500 rpm pour culotter les débris tissulaires et ne prélever que 170 μ L de surnageant. Les étapes suivantes sont les mêmes que celles du kit DNeasy[®] Blood & Tissue. L'élution finale a également lieu en deux phases : la première est réalisée avec 70 μ L de tampon d'élution et la seconde avec 40 μ L. Une fois élué, l'ADN est conservé à -20°C.

II.4.1.3. Analyse qualitative et quantitative de l'ADN

Suite à l'extraction, la qualité de l'ADN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (p/v) après coloration au bromure d'éthidium (BET). L'intégrité de l'ADN est confirmée lorsqu'il présente une taille proche de 20 kpb, sans fragment d'ARN résiduels aux alentours des 2 kpb (Figure II-5).

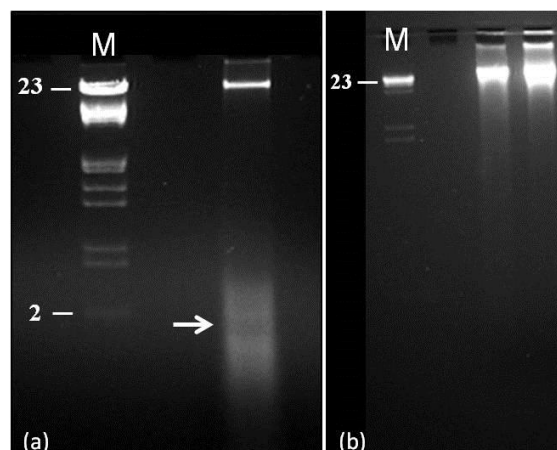


Figure II-5 : Exemple de résultats de la migration d'ADN sur gel d'agarose 1,5% (p/v)

(a) La flèche blanche montre des fragments d'ARN au environ de 2 kpb élués avec l'ADN (b) ADN seul

Les échantillons d'ADN sont ensuite dosés par spectrophotométrie (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Le Nanodrop permet une quantification précise de l'ADN présent dans l'échantillon, il permet également d'estimer la pureté de l'échantillon grâce au ratio d'absorbance 260/280 nm.

II.4.2. Analyse de la génotoxicité par RAPD

Les paragraphes suivants résument les principales étapes d'optimisation de la méthode RAPD sur des embryons âgés de 20 jours après exposition en continu au Cd. La RAPD a été également utilisée pour évaluer la génotoxicité de 3 pesticides sur des embryons de 20 jours et sur des embryons en cours de développement exposés au Cd pendant 24 heures.

Le kit PuRe Taq Ready-To-Go PCR (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) a été utilisé. Il présente l'avantage de proposer des billes lyophilisées contenant les dNTPs, la

BSA et l'enzyme polymérase AmpliTaq™[®] ce qui permet de s'affranchir des étapes de mise au point avec ces 3 réactifs. Pour une réaction d'amplification, sont ajoutés dans un tube PCR, une bille du kit, 5 µL d'amorces (5 pmol/µL), 40 ng d'ADN et de l'eau ultra pure (qsp pour 25 µL) (Figure II-6).

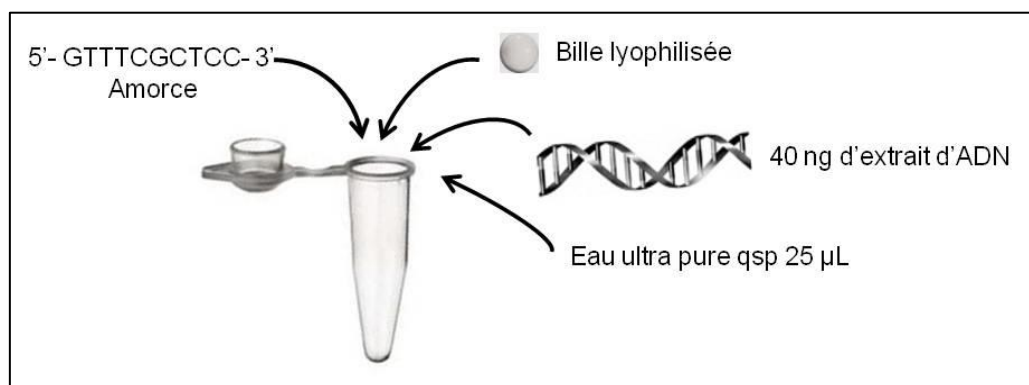


Figure II-6 : Différents réactifs utilisés lors d'une réaction RAPD

La quantité optimale de matrice ADN utilisée lors des réactions d'amplification a été déterminée lors d'un test préliminaire avec 4, 40 ou 400 ng d'ADN (Figure II-7). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une quantité de 40 ng (profils clairs, intensité et nombre de fragments obtenus satisfaisants).

II.4.2.1. Sélection des amorces nucléotidiques

16 amorces ont été testées (Tableau II-1) afin de sélectionner celles donnant, sur un échantillon témoin, des profils d'amplification satisfaisants : nombre de fragments suffisants (> 3) avec une bonne séparation et une forte reproductibilité (nombre de fragments identique chez les échantillons de même nature) afin de pouvoir réaliser des comparaisons de profils. Tous ces critères ont dans un premier temps été évalués après électrophorèse classique sur gel d'agarose. Cette approche a permis de sélectionner 2 amorces (X19 et OPG17) pour la recherche de signes de génotoxicité chez l'embryon après exposition continue au Cd. L'amorce Saad 2 a été utilisée pour l'étude des effets génotoxiques des pesticides.

Tableau II-1: Amorces testées lors des amplifications RAPD-PCR sur les embryons d'*Helix aspersa*.

Nom	Séquences
P 1 (Kit RTG RAPD)	GGTGCGGGAA
P 2 (Kit RTG RAPD)	GTTTCGCTCC
P 3 (Kit RTG RAPD)	GTAGACCCGT
P 4 (Kit RTG RAPD)	AAGAGCCCGT
P 5 (Kit RTG RAPD)	AACGCGCAAC
P 6 (Kit RTG RAPD)	CCCGTCAGCA
H 18	GAATCGGCCA
H 19	CTGACCAGCC
X 19	CCACCGCCAG
OPA 02	TGCCGAGCTG
OPB 08	GTCCACACGG
OPG 05	CTGAGACGGA
OPG 17	ACGACCGACA
Saad 2	GTGCTACGTC
Osama 5	GACCATCGTC
Essam 8	GCTCGAACTT

II.4.2.2. Analyse des profils

Après présélection d'une amorce par électrophorèse sur gel d'agarose, les profils d'amplification obtenus, sur 5 échantillons témoins différents (préparés à partir de 5 pontes différentes), sont analysés par un système d'électrophorèse capillaire haute résolution (SHR, système QIAxcel[®], Hilden, Germany). Le SHR permet une séparation et une détection optimales des fragments constituant les profils d'amplification. Les images de migration obtenues sont de haute qualité comparées à celles issues d'une électrophorèse classique (Figure II-7 et Figure II-8).

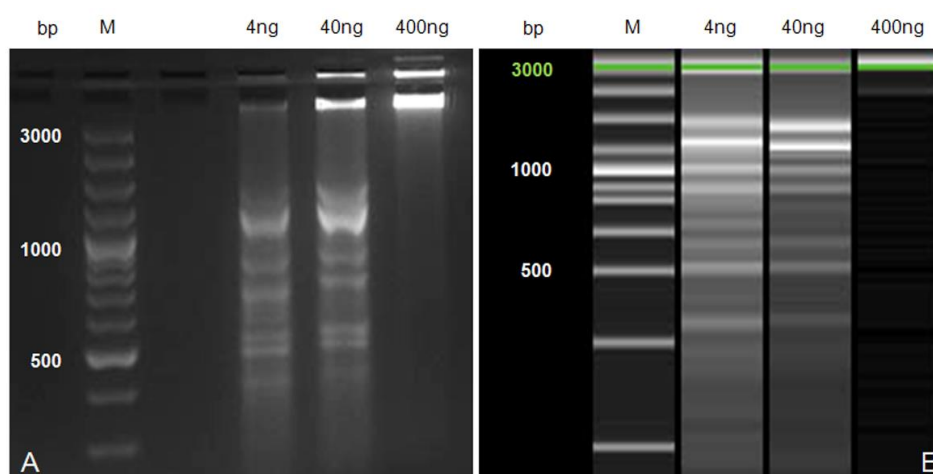


Figure II-7 : Différences de migration entre 2 systèmes d'électrophorèse.

A : système classique, B : système haute résolution, M : marqueur de taille en pb

Le SHR fournit également, en plus d'une image numérisée, un graphique appelé électrophérogramme qui représente la fluorescence détectée pour chaque fragment amplifié par l'appareil en fonction du temps de migration. Ce graphique est généralement composé de pics de fluorescence, chacun correspondant à un fragment composant un profil RAPD (Figure II-8A et B). Le logiciel bioinformatique relié au SHR permet aussi une détection de fragments après une étape de paramétrage (bornes inférieure et supérieure de taille pour chacun des fragments). Les résultats obtenus à partir de ce logiciel sont présentés sous forme d'une matrice binaire où 1 correspond à la présence d'un fragment et 0 à son absence (Figure II-8C). Cette caractéristique du SHR permet une automatisation de la lecture des profils ainsi qu'une analyse haut-débit des échantillons. Avec ce système, 12 échantillons migrent en 10 min sans préparation préalable. Le nombre maximal de lectures pendant une migration est de 96 (soit 1 h 30 min de migration). Les données d'analyse des profils sont disponibles quelques secondes après la fin de la migration des échantillons.

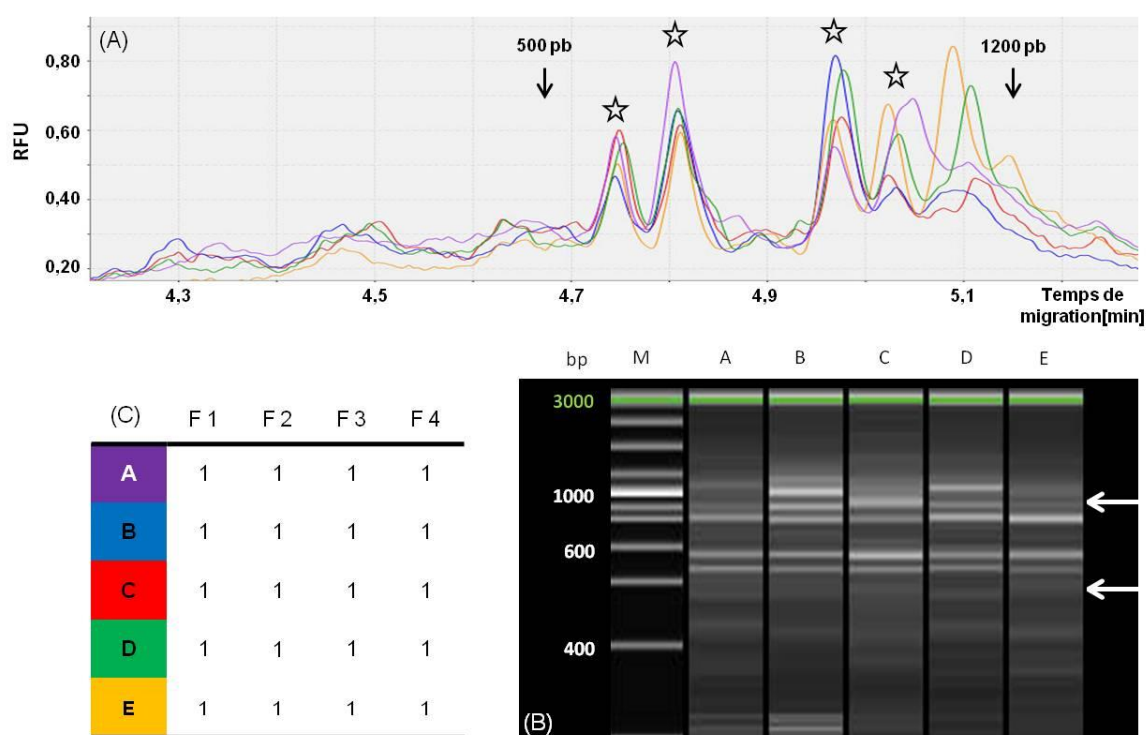


Figure II-8 : Données obtenues avec le Système d'électrophorèse Haute Résolution

(A) : électrophérogramme, (B) : image haute résolution et (C) : matrice de détection. L'explication détaillée de cette figure sera présentée dans le chapitre 4

Les 5 profils témoins obtenus vont permettre de créer un profil dit de référence qui servira aux comparaisons de profils entre les échantillons témoins et les échantillons exposés. Les fragments présents dans 100% des profils des 5 échantillons témoins sont retenus pour les analyses. Le détail de toutes les étapes de l'analyse des profils RAPD est donné dans le chapitre 2.

II.5. Etude de l'expression des gènes des métallothionéines

L'étude portant sur les métallothionéines a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Professeur Dallinger au sein de l'Institut de Zoologie d'Innsbruck en Autriche lors de 2 séjours réalisés au cours de l'année 2013 (1 mois en Juillet et 15 jours en Novembre). Les prélèvements biologiques ainsi que la mise au point des extractions d'ARN sur embryon ont été effectués à Besançon. Les étapes suivantes (extraction des ARN, synthèse d'ADNc, étude de l'expression de gènes en qPCR) ont été effectuées à Innsbruck au cours des 2 séjours.

II.5.1. Extraction d'ARN

Directement après les prélèvements, les embryons sont placés dans un liquide qui stabilise l'ARN (RNA later[®], Ambion[®]) puis conservés à -20°C afin de préserver au mieux les échantillons avant leur transport jusqu'à Innsbruck.

Comme pour l'ADN, les extractions d'ARN ont été réalisées sur embryon en cours de développement (à partir de J1) jusqu'au jeune éclos (J20). Pour les embryons âgés de moins de 7 jours, les faibles quantités de matériel biologique ont nécessité l'emploi du kit RNeasy[®] plus Micro (Qiagen, Hilden, Germany). Les tissus embryonnaires ont été placés dans le tampon de lyse additionné de β -mercapto-éthanol puis homogénéisés par pipetage jusqu'à lyse complète des tissus. Pour les embryons les plus développés (âge > 7 jours), le kit RNeasy[®] Mini a été utilisé. La lyse des tissus pour ces embryons bien développés a été réalisée en deux temps, en broyant les embryons à l'aide d'un pilon en plastique, puis, par pipetage. Les protocoles classiques des 2 kits pour les tissus animaux ont été suivis.

II.5.1.1. Digestion de l'ADN génomique

A 20 μ L d'ARN élué sont ajoutés 2,5 μ L de tampon réactionnel 10X (Invitrogen), 2,5 μ L de DNase I (Invitrogen) et 1 μ L d'inhibiteur de RNase (RiboLock[™], ThermoScientific). Après homogénéisation, les échantillons sont incubés à 25°C pendant 15 min. La digestion de l'ADN génomique est stoppée par ajout de 2,5 μ L d'EDTA et incubation à 65°C pendant 10 min.

La qualité de la digestion et l'intégrité des ARN sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (p/v). Les fragments sont révélés aux UV après coloration au GelRed[™] (Biotum, Hayward, CA, USA).

II.5.1.2. Quantification des ARN

La quantification précise des ARNs extraits a été réalisée via le kit RiboGreen® RNA quantification (Invitrogen). La quantité d'ARN est déterminée à l'aide d'une sonde qui s'intercale entre les bases d'acides nucléiques, le RiboGreen®, dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ARN présente dans l'échantillon. Les mesures ont été réalisées sur un lecteur microplaque VICTOR™ X4 2030 (Perkin Elmer). La relation entre la fluorescence et la quantité d'ARN est déterminée à l'aide d'une courbe étalon qui est réalisée avec des standards d'ARN de concentration connue (0,1 à 100 ng).

II.5.2. Synthèse d'ADNc

L'ADNc simple brin a été synthétisé avec le kit M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (Invitrogen). La synthèse a été réalisée en 3 étapes.

II.5.2.1. Hybridation des amorces

Chaque réaction est réalisée à partir de 250 ng d'ARN avec 2,5 µL d'amorces Random Hexamer (Fermentas) et d'eau DEPC pour un volume final de 27,5 µL. Les échantillons sont incubés durant 5 min à 70°C dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf).

II.5.2.2. Transcription

Les volumes des réactifs présentés dans le tableau ci-après (Tableau II-2) sont ajoutés aux échantillons après l'hybridation pour obtenir un volume final de 50 µL. Des échantillons dépourvus d'enzyme RevertAid™ H Minus M-MLV (Fermentas) servent de contrôle négatif.

Tableau II-2 : Réactifs utilisés pour la synthèse ADNc

Réactifs	Volume pour une réaction
5X reaction MuLV RT buffer	10 µL
dNTP's	5 µL
RiboLock™ (inhibiteur de RNase)	1,25 µL
Eau DEPC	5,75 µL
Enzyme RevertAid™ H Minus M-MLV	0,5 µL

II.5.2.3. Synthèse

Les échantillons sont incubés dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf), en utilisant le programme ci-dessous puis ils sont conservés à -20°C jusqu'aux étapes suivantes (Tableau II-3).

Tableau II-3 : Programme utilisé pour la synthèse d'ADNc

Etapes	Température [°C]	Temps [min]
Hybridation	25	10
Extension	42	60
Extension finale	70	10

II.5.3. Mesures d'expression des gènes par PCR en temps réel

Les mesures d'expression des 3 isogènes des *MTs* ont été réalisées par PCR en temps réel dans les mêmes conditions que lors des travaux sur les adultes d'*H. aspersa* de Höckner et al. (2011). Chaque mesure sur un échantillon a été réalisée en triplicat afin d'obtenir des résultats fiables et d'éviter les erreurs de quantification dues au pipetage. Chaque valeur obtenue est donnée par la moyenne des 3 valeurs mesurée (1 par triplicat) pour un même échantillon.

Un thermocycleur de type 7500 Real Time PCR System (AB applied Biosystems, USA) a été utilisé avec le kit Power SYBR[®]Green (AB applied Biosystems, USA). Pour l'ensemble des réactions PCR, pour chacune des 3 isoformes de *MTs*, les différents couples d'amorces spécifiques à chaque gène ont été utilisés à une concentration optimale. Le tableau ci-dessous (Tableau II-4) donne les informations concernant ces amorces.

Tableau II-4 : Séquence et concentration optimale des amorces spécifiques des 3 gènes des métallothionéines utilisées en qPCR

Amorce	Concentration [nM]	Taille de l'amplicon (pb)	Séquence
<i>CdMT</i> sens	300	56	5'-GCC GCC TGT AAG ACT TGC A-3'
<i>CdMT</i> antisens	900		5'-CAC GCC TTG CCA CAC TTG-3'
<i>CuMT</i> sens	900	74	5'-AAC AGC AAC CCT TGC AAC TGT-3'
<i>CuMT</i> antisens	900		5'-CGA GCA CTG CAT TGA TCA CAA-3'
<i>CdCuMT</i> sens	900	59	5'-TGT GGA GCC GGC TGT TCT-3'
<i>CdCuMT</i> antisens	300		5'-CAG GTG TCA TTG TTG CAT TGG-3'

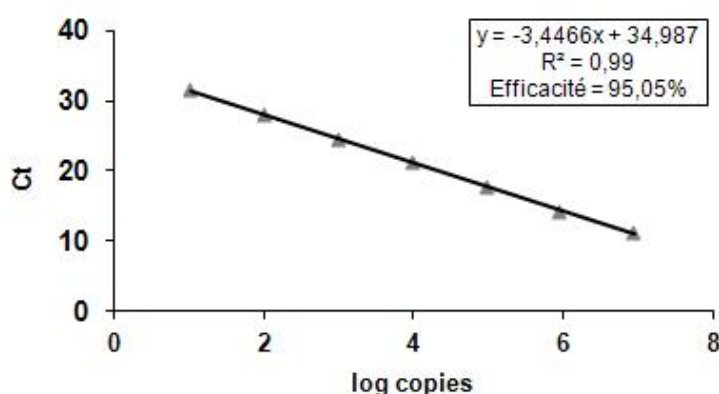
Un pré-mix est ensuite réalisé pour chacun des 3 couples d'amorces. Pour un échantillon, 2 µL de BSA 10X (Sigma-Aldrich, USA) sont ajoutés à 2 µL d'amorce sens, 2 µL d'amorce antisens (chacune à la concentration optimale) et 2 µL d'eau ultra pure.

Des plaques 96 puits ont été utilisées pour les mesures. 10 µL de Power SYBR[®]Green ont été distribués par puits puis 8 µL de pré-mix. Enfin, 2 µL d'ADNc ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite recouverte d'un film adhésif (MicroAmp[®], AB applied Biosystems, USA) afin d'éviter l'évaporation durant la PCR. Le programme d'amplification présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau II-5) a été utilisé :

Tableau II-5 : Programme d'amplification utilisé en qPCR

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	40

Les résultats bruts obtenus suite aux amplifications par PCR quantitative sont exprimés en Ct (*Cycle Threshold* ou cycle seuil), ce dernier étant déterminé automatiquement par le thermocycleur. Le Ct correspond au cycle d'amplification à partir duquel le signal de fluorescence mesuré (en début de phase exponentielle) est statistiquement différent du bruit de fond. L'efficacité des réactions PCR a été également déterminée automatiquement pour chacun des 3 couples d'amorces (95% à 99%). Des travaux antérieurs (mémoire de master réalisé à Innsbruck) effectués à l'aide de courbes standards ont permis de déterminer les relations linéaires existantes entre le logarithme du nombre de copies du gène initialement présentes dans l'échantillon et le Ct mesuré pour chacun des 3 gènes des *MTs* (Figure II-9, pour le gène *CdMT*). Les valeurs de Ct moyen sont calculées à partir des triplicats pour chacun des échantillons. Le Ct moyen est ensuite converti en logarithme du nombre de copies du gène initialement présent dans l'échantillon à partir des relations déterminées grâce à la gamme étalon. Ces relations sont données dans la Figure II-10 pour chacun des 3 gènes étudiés. Les résultats sont finalement exprimés en nombre de copies d'ARN/10 ng d'ARN total.

Figure II-9 : Courbe standard pour le gène *CdMT*

Ct : cycle seuil

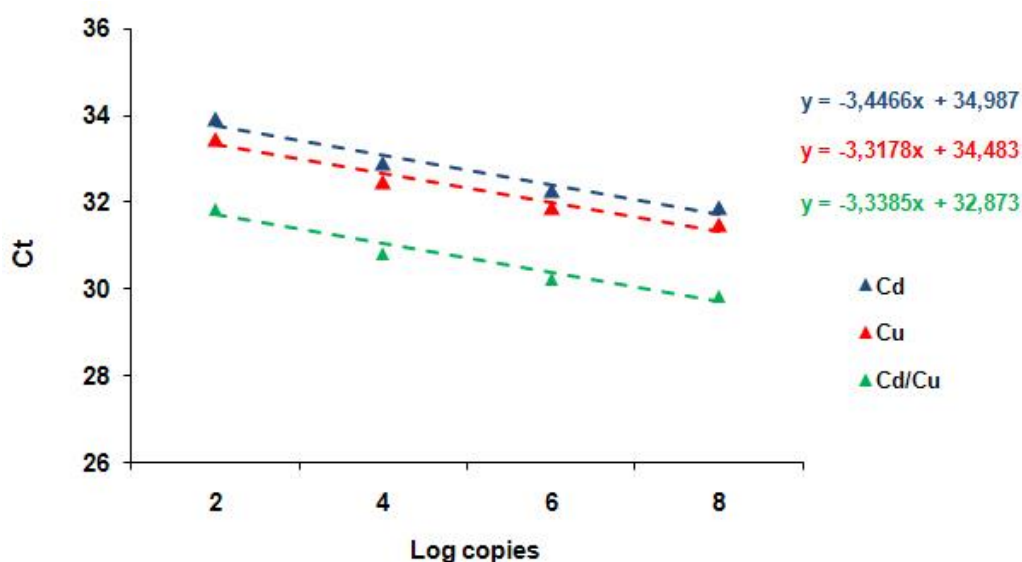


Figure II-10 : Courbes standards utilisées pour le calcul du nombre de copies des gènes des 3 métallothionéines à partir des valeurs de Ct

Synthèse du matériels et méthodes

Tableau II-6 : Résumé des expériences réalisées et des techniques mises en oeuvre au cours de la thèse.

Contaminant(s)	Exposition	Jours de prélèvements	Type d'expérience
Cd (6 mg/L)	Continue	J3, J6, J10, J15, J17-18, J20	Dosage œufs Observations développement, Détection fragmentation ADN
Cd (40 µg/L et 4 mg/L) B.Bordelaise (0,5 g/L de Cu)	Continue	J3, J6, J10, J15, J17-18, J20	Observations développement
Cd (2 - 4 - 6 mg/L)	Continue	J20	RAPD, Détection fragmentation ADN Expression gènes MTs
Cd (5 - 10 - 15 mg/L)	24h à J0 et J6	J1, J6, J12 et J7, J12	Dosage œufs, RAPD Détection fragmentation ADN Expression gènes MTs
Round UP® (15 - 30 - 50 - 70 mg/L) Corail® (0,05 - 0,1 - 0,15 mg/L) B.Bordelaise (0,5 à 2 g/L de Cu)	Continue	J20	RAPD, Détection fragmentation ADN
B.Bordelaise (0.5 - 1,5 g/L de Cu)	Continue	J20	Expression gènes MTs

II.6. Références bibliographiques

D

- Druart, C., Scheifler, R., de Vaufleury, A., 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *J. Hazard. Mater.* 184, 26–33.
- Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., de Vaufleury, A., 2012. Landsnail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. *Appl. Soil Ecol.* 53, 56–64.

G

- Gomot, A., 1997. Effects of heavy metals on the development of snails: Heavy metal pollution bioindicators for human health. *Bull. Acad. Natl. Med.* 181, 59–75.
- Gomot de Vaufleury, A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 41–50.
- Gomot, L., Deray, A., 1987. Les escargots. *La recherche* 302–311.

H

- Höckner, M., Stefanon, K., de Vaufleury, A., Monteiro, F., Pérez-Rafael, S., Palacios, O., Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Physiological relevance and contribution to metal balance of specific and non-specific metallothionein isoforms in the garden snail, *Cantareus aspersus*. *Biometals* 24, 1079–1092.

I

- ISO 15952:2006. Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helicidae) - Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol. *Qualité du sol*.

K

- Kerney, M., Cameron, R.A.D., 2006. A field guide to the land snails of Britain and North-West Europe, French ed. ed. Delachaux et Niestlé SA, Paris.

PARTIE III. Résultats

III.1. CHAPITRE 1 Mesure des effets embryotoxiques de contaminants métalliques chez l'embryon d'escargot terrestre *Helix aspersa*

III.1.1. An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization.

Cette partie a fait l'objet d'une publication acceptée en août 2014 dans la revue *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Les auteurs sont Pierre-Emmanuel Baurand, Nicolas Capelli, Renaud Scheiffler et Annette de Vaufléury.

Résumé

Le bioessai en phase liquide utilisant les œufs d'escargot terrestre *Helix aspersa* permet d'évaluer l'embryotoxicité de contaminants variés via la mesure du taux d'éclosion. Les données obtenues via ce bioessai ne permettent qu'une mesure de toxicité en fin d'exposition (15 à 20 jours) comme l'a montré Druart et al. (2010, 2012) en mesurant le taux d'éclosion et en observant les malformations de l'embryon à des contaminants métalliques (Cd) ou organiques (RU®). Le but de ce travail est de trouver de nouveaux paramètres mesurables au cours du développement embryonnaire de l'escargot et pouvant rendre compte d'un effet toxique afin d'améliorer nos connaissances sur les effets du Cd chez l'embryon d'escargot. La recherche de ces critères de mesure a été calibrée lors d'une exposition en continue à 6 mg/L de Cd. Divers paramètres ont été suivis comme la taille des embryons après 3, 6 et 10 jours, les battements cardiaques à 7 jours, l'aspect des embryons non éclos à 17 jours, les retards d'éclosion et le poids des jeunes escargots éclos ou encore l'apparition d'une fragmentation de l'ADN. Enfin, les concentrations en Cd dans les œufs ont été mesurées pendant la durée de l'exposition. Les résultats montrent que les battements cardiaques diminuent chez les exposés alors qu'un effet sur la taille des embryons n'est visible qu'après 10 jours d'exposition (taille plus petite chez les exposés). Jusqu'à 75% des embryons non éclos à 17 jours sont malformés et morts. Un retard d'éclosion de 4 jours a été démontré chez les exposés. La fragmentation de l'ADN n'apparaît qu'en fin d'exposition (20 jours), ce qui démontre la faible sensibilité de ce critère de mesure. Les concentrations en Cd dans les œufs restent stables entre les jours 3 et 20 (19 à 27 µg/g MS).

Mots clés : succès d'éclosion, taille, battement cardiaque, fragmentation de l'ADN



An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization



III.1.1.1. Introduction

For the past 15 years, early life stages (ELs) have been the subject of numerous studies aimed at assessing the toxicity of chemicals, especially in aquatic environments (Gomot, 1998; Gopalakrishnan et al., 2008; Ismail and Yusof, 2011). Because the embryonic phase is an essential step in the life cycle and thus a key element of population dynamics (Laskowski, 1997; Caswell 2000), it is relevant to focus on this life stage. However, it has been relatively understudied until now, at least in terrestrial environments. Primarily for the ELs of aquatic species, and particularly for mollusks, there is a large range of endpoints that can be measured to assess the embryotoxicity of pollutants from the molecular level (e.g., with genotoxicity assessment; Mai et al., 2012) to the physiological level (e.g., abnormalities, size, heart rate measurement; Schirling et al., 2006) and/or to the classical measurements of hatching rate or survival. More specifically, Gomot (1998) has shown rapid developmental arrests in eggs of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* exposed to 400 µg/L of cadmium (Cd) and has also reported anomalies during embryogenesis (e.g., foot formation, formation of the eyes). In *Lymnaea luteola* L. eggs, Khangarot and Das (2010) showed that copper concentrations from 100 to 320 µg/L caused incomplete development of the foot, eyes, tentacles and digestive gland, shell thinness, developmental arrests and delays in hatching. These parameters (mortality, hatching success) or developmental endpoints (e.g., size of embryos, malformations, growth inhibition) have been applied to characterize the embryotoxicity to *L. stagnalis* of various compounds such as tributyltin (TBT) and common solvents (Bandow and Weltje, 2012), surfactants (Mazur et al., 2013) and lead (Munley et al., 2013). In another aquatic snail (*Marisa cornuarietis*), the use of endpoints such as the formation of eyes and tentacles, heart rate, egg hatching rates and weight after hatching allowed the evaluation of the effects of various contaminants: solvents, an artificial hormone (EE2), Cd (Schirling et al., 2006), zinc, nickel and pesticides (Sawasdee and Kohler, 2009). Eggs of the snail *Biomphalaria glabrata* were used by Ansaldo et al. (2009) to find useful parameters for a toxicity bioassay after 96 h of exposure to different concentrations of trace elements: lead,

arsenic and Cd. They reported adverse effects in Cd-exposed embryos from a concentration of 0.05 mg/L such as delays in hatching time (twofold longer) compared with the control group and no survival at the highest tested concentration (0.1 mg/L).

Although various complementary endpoints are available for measuring the toxicity of pollutants in the ELSs of aquatic snails, few data concerning terrestrial species whose eggs are incubated in the soil are available. It is probable that one reason for this scarcity is the presence of a calcareous capsule surrounding the eggs, which prevents simple observations of embryogenesis and, thus, of the developmental effects of chemicals.

However, methods of exposure exist for terrestrial snails: Druart et al. (2010, 2012) have developed a bioassay (Liquid-Phase Bioassay – LPB) using eggs of the ubiquitous species *Cantareus aspersus* to determine the toxicity of chemicals. Embryotoxic effects (EC_{50-Cd}, abnormalities and developmental delays) after 20 days of exposure to Cd solution (2 to 10 mg/L) were observed (Druart et al., 2010). The ELSs of *C. aspersus* exposed to Cd were blocked at different stages of embryogenesis, depending on the concentration of the Cd solution. Variations in response among individuals exposed to the same concentration (4 mg Cd/L) were recorded, with embryos blocked either at the beginning of their development (gastrula stage) or later (metamorphosis). At 6 mg Cd/L, malformations in the cephalic region and the absence of the eyespot were reported, whereas at 8 and 10 mg Cd/L, embryos were small and malformed and never hatched. In the same species, Baurand et al. (2013) have used Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and a high-resolution capillary electrophoresis system to detect signs of genotoxicity in embryos exposed early in their embryogenesis to Cd solutions (2, 4 and 6 mg/L). DNA laddering in 20-day-old embryos exposed to 6 mg Cd/L has also been reported.

The aim of this study is to complete the range of endpoints measurable throughout the development of embryos of *C. aspersus* to assess embryotoxicity. For this purpose, morphological (size, abnormalities of embryos) and physiological (heart rate) measurements were performed on eggs of *C. aspersus* exposed to Cd. This work focuses on Cd, which is one of the most toxic chemical elements, classified by the U.S. Environmental Protection Agency as a priority pollutant. Cd is also on the European Community's Black List of chemicals (ATSDR, 1999; Friberg et al., 1992). Another objective was to look for the delayed appearance of genomic DNA fragmentation in embryos in relationship to the kinetics of Cd accumulation in eggs.

III.1.1.2. Materials and methods

Chemicals and Cd measurement procedure

A Cd solution was prepared with solid cadmium chloride (CdCl_2 , 99.99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; C-2544) dissolved in demineralized water (pH 6.2). Demineralized water was also used as the control solution. A nominal concentration of 6 mg Cd/L was chosen due to its known inhibiting effect on the hatchability of snail eggs (Baurand et al., 2013; Druart et al., 2010). Preliminary results obtained with copper sulfate (CuSO_4) and chloride (CuCl_2) or HgCl_2 and $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ as for aluminum with AlCl_3 and $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (in a range from 0.1 to 1000 mg/L) did not show any difference of toxicity of these metals on *C. aspersus* embryos. Thus, we assumed that the observed effects obtained with Cd solution will be the result of Cd mainly and not of the chloride concentration. The concentration of the Cd solution was measured using ICP-AES (ICAP 6000 series model radial, Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France). The quality of the results was verified using a water reference standard (Hard Drinking Water, ERM-CAO11a, Molsheim, France) certified at 4.94 $\mu\text{g/L}$ of Cd ($\pm 0.23 \mu\text{g/L}$). The actual concentration was 7.1 mg/L of Cd. The reliability of the Cd measurement procedure in eggs was assessed by applying different types of certified standard reference material such as dogfish liver (DOLT) and lobster hepatopancreas (TORT). Certified values for TORT were 26.7 $\mu\text{gCd/g}$ and 23.4 $\mu\text{gCd/g}$ for the DOLT. Three samples of each reference material were measured (three TORT and three DOLT). The average recovery for the analysis was 93 $\pm 1.76\%$ and the limit of quantification was 0.0017 $\mu\text{gCd/L}$.

Exposure system

Clutches produced by several different sexual mature adults were obtained from our standardized laboratory rearing procedure and were exposed using a liquid-phase bioassay, as extensively described by Druart et al. (2010) and Baurand et al. (2013). This bioassay was used for each experiment described below in section 2.3 to 2.5 (Cd accumulation in eggs, developmental observations, DNA fragmentation detection). For each exposure, fifty reproducers were used to obtain the clutches needed for the experiment (details on the reproduction phase are given in ISO 15952). Each clutch (between 80 to 120 eggs) was separated into groups of 10 eggs. Entire eggs (with their shell) were placed in Petri dishes on 4 layers of paper (Quantitative filter paper grade 1 ashless, Whatman) dampened with 0.8 mL of control or Cd solution. Every clutch was divided in subsamples of 10 eggs and thus exposed to each treatment. Eggs were exposed rapidly after the end of the laying period (24 h maximum) during all the development of embryos (20 days).

Accumulation of Cd in eggs

Three replicate clutches were used to determine the kinetics of Cd accumulation in eggs exposed to a liquid solution of 6 mg/L. A pool of 5 entire eggs from the 3 clutches (Cd-exposed and control) was sampled at day 0, 3, 6, 10, 15 and 20, and Cd concentrations were determined using ICP-MS (X series II, Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France). Each pool of 5 eggs coming from one same clutch constitutes a point of Cd measurement. For each date investigated, 3 points (= 3 pools of 5 eggs) were measured except at day 20 where 2 points were analyzed. Before measurement, eggs were dried in an oven (50°C) and weighed daily with a precision balance (0.001 g) to constant mass and, thus digested in 300 µL of HNO₃. Ultrapure water was added to a final volume of 15 mL.

Assessment of toxic effects on snail embryos

Size of embryos

Four other clutches were used for developmental monitoring. However, because the eggs of *C. aspersus* have a calcareous eggshell surrounding the transparent albumen in which the embryo develops (Baurand et al., 2013), the removal of the eggshell with a pair of dissecting forceps is necessary to observe the development of embryos through the albumen. Therefore, after exposure to 3, 6, and 10 days, eggs were removed from their eggshell (10 eggs from each of the 4 clutches (exposed or control) per date investigated) and photographs of embryos without an eggshell were taken with an inverted microscope (Zeiss AxioImager M2). For the first 2 exposure periods (3 and 6 days), the perimeter of embryos was measured with Axiovision 2 software (Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos, Germany). At day 10, the measurement of the perimeter was not relevant due to the rotational movement of the embryos. Thus, size classes were determined according to the surface area, i.e. the filling of the egg by the embryo (Fig. 2(a)). Four classes were determined: embryos occupying more than 90% of the space in the albumen were assigned to the large size class, and those occupying between 90% and 70% of the space were assigned to the medium size class. The 2 other size classes were small (between 70% and 50%) and very small (<50%).

Other endpoints

After 7 days of exposure, the heart rate of the embryos (eggs coming from each of the 4 different clutches) was recorded under an inverted microscope by adding the results of 3 consecutive counts of 20 sec after the removal of the eggshell. We followed the same protocol as Barjhoux et al. (2012) used on medaka embryos. To detect hatching delays, eggs from each of the 7 clutches were used and the number of hatched embryos (control or Cd-exposed) was

checked daily from day 15 to day 20 after the beginning of incubation. At day 17, 22 non-hatched eggs from 2 clutches were opened to observe their developmental states and abnormalities. Observations were classified in 3 groups: live embryos, dead embryos showing edema and disaggregated dead embryos. An embryo was defined as alive if it showed rotational movements within the albumen and foot movements or a heartbeat. All the results were considered valid if the hatching success of the controls was at least 70% (the average value observed for controls in our laboratory colony). Furthermore, the fresh weight of newly hatched snails was recorded.

DNA fragmentation detection

Two replicate clutches were used to assess the fragmentation of genomic DNA in Cd-exposed and control embryos. Eggs were sampled on days 6, 10, 15, 18 and 20. DNA extractions were performed on 25 mg of fresh mass of embryos extracted from albumen (Baurand et al., 2013) using the DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with the addition of RNase A (100 mg/mL). The purity of the DNA was checked on 2% agarose gels stained with ethidium bromide (EtBr) after an electrophoresis migration in TBE 1X buffer for 1 hour at 60 V.

Statistical analysis

All statistics were performed with R (2.13.2) (R Development Core Team, 2004, <http://www.R-project.org/>). The homogeneity and normality of data were tested using respectively the Bartlett test and the Kolmogorov-Smirnov test. If variables were normally distributed and variances among groups were homogeneous, a parametric test (Student's t-test) was used. Comparisons of Cd accumulation in the eggs between sampling dates were performed with a non-parametric Kruskal-Wallis test. The distribution of embryo size classes, the delays of hatching and the hatching success were analyzed with a χ^2 test. All the other statistical comparisons were performed with a non-parametric Mann-Whitney *U* test.

III.1.1.3. Results

Cadmium accumulation in eggs

Cd concentrations in the control eggs remained lower than 0.1 µg/g throughout development (from day 0 to 20). The Cd concentration (Tableau III-1) was higher for the Cd-exposed eggs than for the control eggs ($W = 0$, $p < 0.0001$). No significant differences were found among the Cd concentrations in the eggs on days 3, 6, 10, 15 and 20 ($KW = 2.46$, $df = 4$, $p\text{-value} = 0.65$).

Tableau III-1 : Cadmium concentrations in eggs during development.

Concentrations are given in µg/g dry mass (DW). For each point of measurement, pooled samples (5 eggs) from three replicate exposures were considered, showing means and standard deviations (in brackets) except for day 20 where the 2 values are given in brackets. For each observation time, $n=3$ except for day 20 ($n=2$).

Time of exposure (days)	0	3	6	10	15	20
Cd concentration (µg/g of dry mass)						
Control eggs	0.001 (+/- 0.003)	0.019 (+/- 0.001)	0.011 (+/- 0.007)	0.042 (+/- 0.022)	0.032 (+/- 0.021)	0.074 (0.03–0.11)
Eggs exposed to 6 mgCd/L		19.34 (+/- 8.12)	21.56 (+/- 7.82)	22.52 (+/- 9.24)	26.69 (+/- 8.40)	27.59 (19.49–35.69)

Developmental parameters in the first 10 days

No significant parameter differences were detected between control and Cd-exposed embryos (Figure III-1(a)) after 3 days ($t = 0.60$, $df = 87.36$, $p = 0.55$) and 6 days of exposure ($t = 1.58$, $df = 97.63$, $p\text{-value} = 0.12$). The heart rate at 7 days of development of the Cd-exposed embryos was significantly lower than that of the controls (Figure III-1(b)). After 10 days of development, the distribution of sizes among the 4 size classes differed significantly between the exposed and control embryos ($\chi^2 = 23.04$, $df = 3$, $p < 0.0001$). As shown in Figure III-2(a), most of the control embryos belonged to the large size class (44%, $\chi^2 = 15.07$, $df = 1$, $p < 0.0001$), whereas few very small embryos (8%, $\chi^2 = 5.14$, $df = 1$, $p = 0.02$) were found in the controls compared with the Cd-exposed group. The size distribution was quite different in the Cd-exposed embryos, most of which were of small size (35%, $\chi^2 = 4.9$, $df = 1$, $p = 0.03$) or very small size (28%), and large embryos were a minority (7%), whereas no significant differences between control and Cd-exposed embryos were found in the medium size class ($\chi^2 = 0.05$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.81$) (Figure III-2(b)).

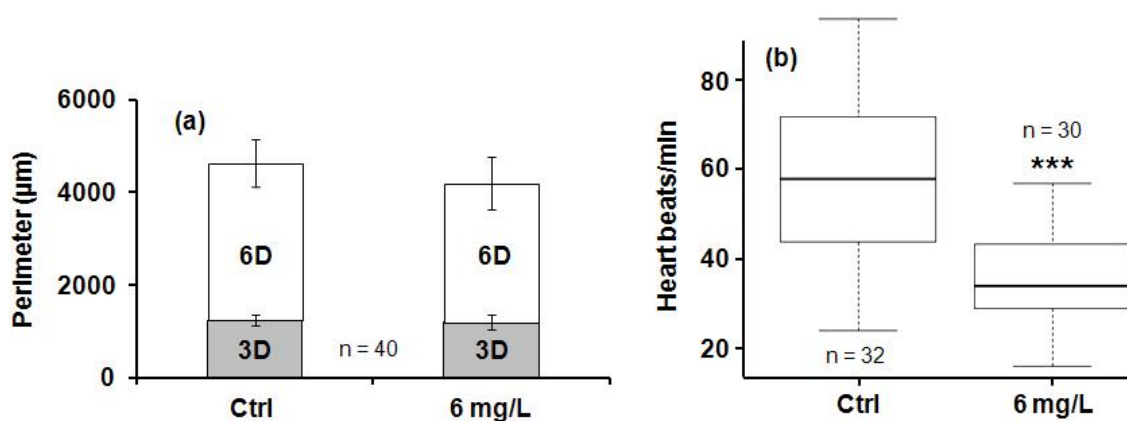


Figure III-1 : (a) Perimeter at 3 (3D) and 6 days (6D) of development for control (Ctrl) and Cd-exposed (6 mg/L) embryos. (b) Heart rate after 7 days of exposure.

(a) Black bars represent the SD. (b) Significant differences (Student's t-test, $p < 0.001$) are indicated by ***. Box plots indicate the median values (bold line) for each group, the edges of the boxes are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles.

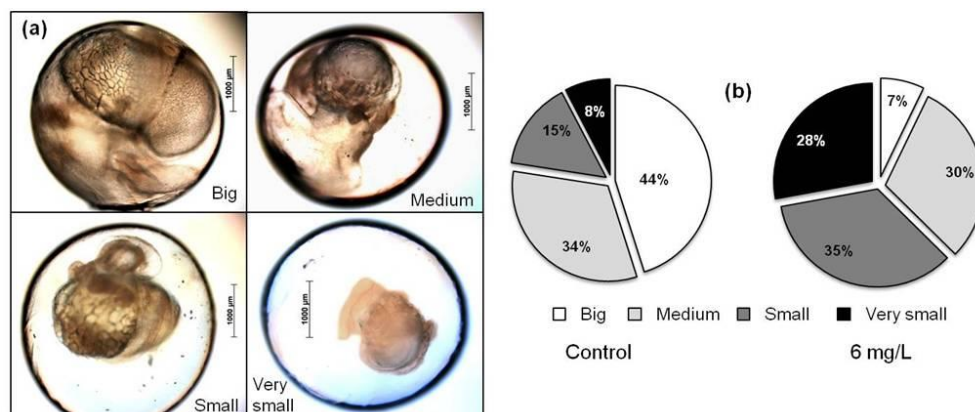


Figure III-2 : (a) Photographs of the 4 groups used for size classification, scale bar = 1000 μm. (b) Size-class distribution after 10 days of development for control ($n = 39$) and Cd-exposed embryos (6 mg/L, $n = 40$).

Developmental parameters from 15 to 20 days

In the control group, the proportion of newly hatched snails did not differ between the 15th and the 19th day ($\chi^2 = 0.68$, $df = 2$, $p = 0.71$). The proportion of hatched snails was significantly higher in the control group than in the Cd-exposed group (Figure III-3) at day 15, 17, and 19 (χ^2 respectively = 184.2 ; 153.9 ; 123.6 ; $df = 1$, $p < 0.0001$). For Cd-exposed eggs, the proportion of hatched snails increased significantly between the 15th and the 19th day ($\chi^2 = 14.72$, $df = 1$, $p = 0.0001$). The maximum delay in hatching was 4 days. On day 19, the hatching success was significantly lower ($\chi^2 = 233.7$, $df = 1$, $p < 0.0001$) for the eggs/embryos exposed to 6 mg Cd/L than for the controls (Figure III-3). Furthermore, the fresh mass of the Cd-exposed embryos (Figure III-4(a)) was significantly lower than that of the controls ($W =$

9288.5, $p = 0.006$). After 17 days of exposure, 25% were alive (Figure III-5(a)), 10% of the non-hatched embryos were dead and presented edema (Figure III-5(b)) and the rest (65%) were dead and showed signs of disaggregation (Figure III-5(c)).

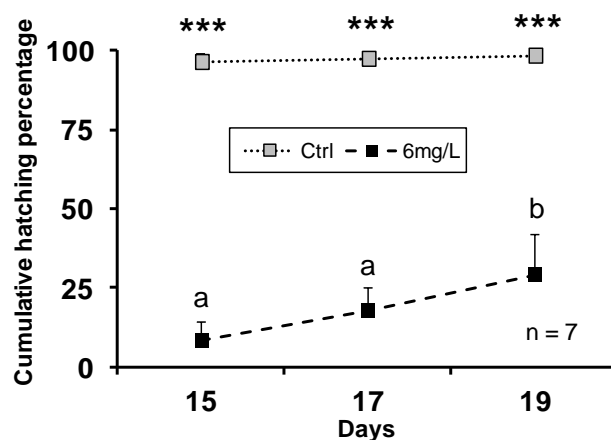


Figure III-3 : Cumulative hatching percentage from 15 to 19 days for control (Ctrl) and Cd-exposed (6 mg/L) snail eggs from 7 clutches.

Mean values are represented (black bars show SD). ***: Significant differences (χ^2 , $p < 0.0001$) between control and exposed groups. a, b: significant differences in cumulative hatching percentage between exposure durations for eggs exposed to 6 mg Cd/L (χ^2 , $p = 0.0001$).

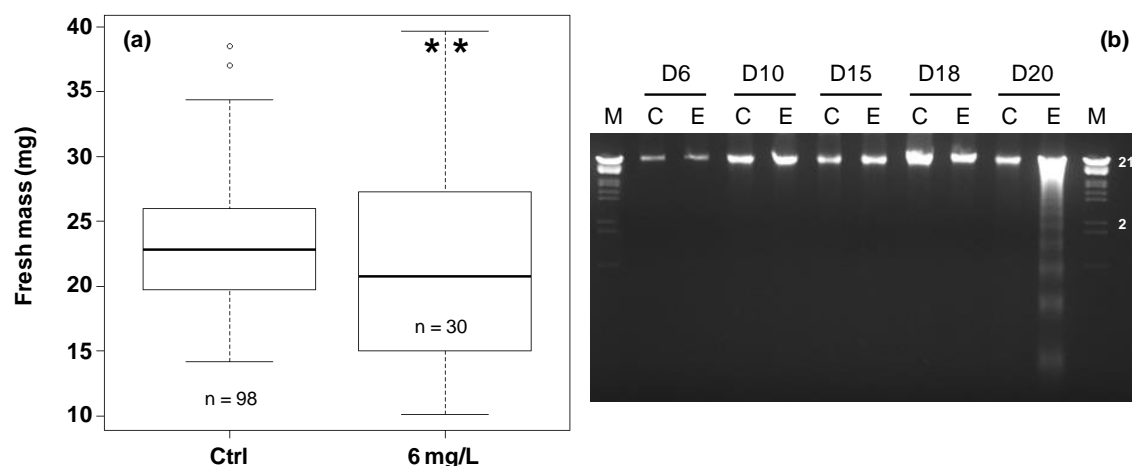


Figure III-4 : (a) Fresh mass of newly hatched control (Ctrl) or Cd-exposed (6 mg/L) snails. (b) Genomic DNA pattern of control and exposed snail eggs based on 2% agarose gel electrophoresis.

(a) Box plots indicate the median values (bold line) for each group, the edges of the boxes are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The 2 white dots are the extreme values. Significant differences (Mann-Whitney U test, $p < 0.01$) are indicated by **. (b) M: Lambda DNA Hind III marker with size given in kbp. C: control, E: Cd-exposed. D6-10-15-18-20: Days 6, 10, 15, 18, and 20, respectively. Genomic DNA until 18 days is totally intact with a size of 21 kbp. At day 20, DNA presents multiple fragments of low molecular weight (< 2 kbp) with laddering shape.

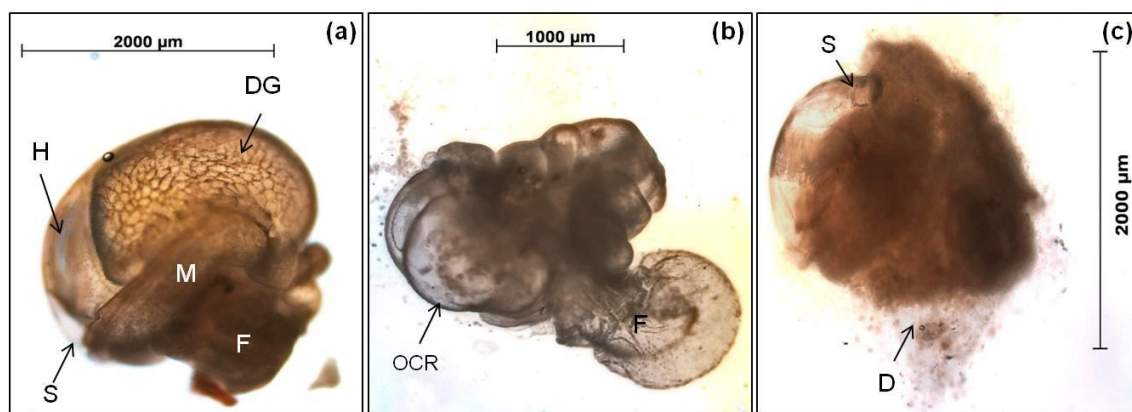


Figure III-5 : State of development of *Cantareus aspersus* embryos after 17 days of exposure to 6 mg/L Cd.

(a) live embryo, (b) embryo showing edema, (c) dead embryo beginning decomposition. OCR: edema in cephalic region; S: shell; H: heart; M: mantle; F: foot; DG: digestive gland; D: signs of decomposition.

DNA fragmentation analysis

The DNA extracted from control embryos or Cd-exposed embryos at days 6, 10, 15 and 18 showed no signs of fragmentation. On day 20, Cd-exposed embryos showed an accumulation of low-molecular-weight DNA fragments, i.e., DNA laddering (Figure III-4(b)). DNA laddering was not visible in the DNA of the control embryos.

III.1.1.4. Discussion

Little information has been published about the embryotoxicity of chemicals during the embryogenesis of terrestrial snail species. The results of this study make it possible to examine the kinetics of the Cd concentrations in the eggs in relationship to the kinetics of the effects at different levels of biological organization in the embryos.

Observations of the embryos during the first portion of their development (at 3 and 6 days) suggested that exposure to 6 mg/L Cd had no observable effect on size before 6 days. The cardiac function of embryos was significantly decreased in exposed embryos at 7 days. Lui et al. (2013) also demonstrated a significant decrease in heart rate in isolated eggs of *Radix auricularia* during exposure to 5 µg/L of Cd. *Similarly, a* decrease in heart rate was observed in zebrafish embryos at exposures between 250 µg Cd/L and 10 mg Cd/L (Hallare et al., 2005). This heart rate modification may be a result of the competition of Cd with calcium (Ca^{2+})-dependent pathways that are essential to the normal functioning of the cardiac system in mollusk species (Lui et al., 2013). Because little is known about the precise mechanisms involved in such cardiovascular dysfunctions, further studies are needed to better understand this impact of Cd on heart rhythm.

At 10 days, the size of the majority of Cd-exposed embryos was significantly reduced in comparison with the control group. This late effect of Cd on development at 10 days was followed by a significant decrease in the fresh mass of newly hatched Cd-exposed snails at 19 days. In aquatic species, Jezierska et al., (2009) have shown that larvae of *Clupea harengus* hatched from metal-exposed eggs are smaller than those from an uncontaminated environment. Two endpoints used in our study (size at 10 days and fresh mass of newly hatched embryos) confirmed that Cd has an adverse effect on embryos visible during the second part of embryogenesis (after 10 days). This effect could be explained by Cd toxicity to many signaling pathways or cellular mechanisms that are essential for normal organism development and survival (Chow and Chen, 2003), including ionic interference with other divalent ions such as Ca^{2+} and Mg^{2+} . Other types of interference can occur, such as oxidative stress, apoptosis, genotoxicity and cell cycle disturbance by Cd (Thompson and Binnigan, 2008). Furthermore, it has been demonstrated, e.g., in fish embryos, that trace metals may adversely affect various metabolic processes, resulting in developmental delays and morphological and functional anomalies and, additionally, activating energy-consuming detoxification processes. Thus, less energy is available for growth in fish exposed to toxins (Jeizierska et al., 2009). It is possible that this relationship can explain the retardation of growth demonstrated in *C. aspersus* embryos after 10 days of exposure. At 17 days, the majority of non-hatched eggs/embryos (75%) are dying, as shown by several signs of malformation, such as edema (10%) or disaggregation (65%). Head edema in freshly hatched zebrafish embryos exposed to Cd has been reported by Hallare et al. (2005). The disaggregation of embryos observed after 17 days of exposure can be linked to DNA fragmentation (laddering), as previously shown by Baurand et al. (2013). It is known that internucleosomal fragmentation is one of the signs of apoptosis. It can be a response to an excessive accumulation of toxic metals, such as Cd, in many organisms (Creagh et al., 2000), which affects the balance of reactive oxygen species (ROS) (Thévenod, 2009) responsible for the inhibition of enzymes involved in DNA synthesis and repair. Agnello et al. (2006) found DNA fragmentation in *P. lividus* after 38 h of exposure to 100 μM of CdCl_2 and considered this DNA damage to represent a final event in the induction of apoptosis through the activation of caspase-3.

In terms of the kinetics of the appearance of fragmentation in our study (found only after 20 days of exposure), DNA laddering permits a very late detection of the effect at the genomic level, whereas signs of death (disaggregation/malformations) are observable from 17 days of exposure. The detection sensitivity of the DNA laddering method is low, as

previously stated by Baurand et al. (2013), and this method can detect only a very high level of DNA damage.

The monitoring of the hatching period showed a delay of 4 days: the hatching success of the exposed embryos increased significantly between day 15 (8%) and day 19 (29%). A delay of hatching in isolated snail embryos, *M. cornuarietis*, has also been demonstrated at concentrations up to 250 µg Cd/L (Schirling et al., 2006). Lastly, according to Druart et al. (2010) and Baurand et al. (2013), a significant decrease in the hatching rate has been observed after 20 days of exposure. In addition to all mechanisms mentioned above, the hatching failure of Cd-exposed eggs may also be the result of the inhibition of normal hatching enzyme activity by Cd, as previously suggested by Hallare et al. (2005) in zebrafish embryos.

The measurement of the Cd concentration in eggs gives information about the kinetics of Cd transfer from the exposure medium to the eggs. In our experiments, the Cd concentrations in whole eggs remained stable from the 3rd day of exposure (between 20 and 27 µg Cd/g DW). However, this finding does not mean that the Cd concentration does not change in various portions of the eggs. Indeed, Druart et al. (2010) have demonstrated that the Cd concentration is higher in the albumen + embryos compartment than in the eggshell of eggs exposed for 7 days to 4 or 8 mg Cd/L. Thus, the 6 day delay in the occurrence of the effects in our experiment may be related to a delay needed for Cd diffusion throughout the egg structure: *C. aspersus* eggs are composed of a calcareous capsule surrounding a gelatinous matrix (albumen). These two envelopes form a protective covering for the embryo during its development and increase the time for Cd diffusion to the embryo, as reported by Cao et al. (2009). The role of the barrier formed by the egg mass has recently been studied in Lymnaeidae: Lui et al. (2013) also demonstrated the protective role of the gelatinous matrix of the egg mass against threats in the environment during the embryonic development of *R. auricularia* by showing differences in the response to Cd between isolated eggs and intact egg masses. This 6 day window during which effects are not observable at the macroscopic scale can also result from other phenomena such as the existence of a precocious defense system against Cd (e.g., metallothioneins), in embryos. In *C. aspersus* adults, certain proteins, called metallothioneins (MTs), play a major role in metal homeostasis. Three isoforms of MTs are known (Dallinger et al., 1997; Hispard et al., 2008; Höckner et al., 2010), and one of them (CdMT) is induced by Cd. Recent works of Baurand et al. (2014) on MTs in *C. aspersus* have demonstrated a constitutive expression of MTs genes in unexposed embryos from 6 days of development. Authors have also shown that a Cd exposure is able to induce overexpression of CdMT gene. This result suggests that CdMT could play a role in the early defense of embryos

against Cd, at least until the sixth day of exposure, when the ability of the MTs to detoxify Cd is exceeded by the Cd concentration in the albumen.

The low sensitivity to Cd of *C. aspersus* embryos ($EC_{50} = 3.5$ mg/L), compared with the sensitivity ($250 \mu\text{g Cd/L}$) of the aquatic snail *M. cornuarietis* (Schirling et al., 2006) or the effect on hatching success in *L. stagnalis* up to $100 \mu\text{g Cd/L}$ (Gomot, 1998), can be the result of two things. First, differences in structure between the eggs of aquatic and terrestrial snail species, may be responsible for differences in Cd transfer from the exposure solution to the albumen. Species-specific response to Cd could also be implied, possibly due to differences in MT synthesis capacity. Nevertheless, further measurements are needed to better understand the kinetics of Cd transfer from the exposure solution to the embryos and to characterize the true ability of snail embryos to synthesize MT.

In conclusion, this study provides new data on the embryotoxic effect of Cd on the ELSs of the terrestrial snail *C. aspersus*. The study provides information on the kinetic of appearance of toxic effects, with the first detectable signs appearing in the form of modifications of cardiac function (after 7 days of exposure to Cd), whereas the effect on size appeared later in embryonic development (after 10 days of exposure). The kinetics of genomic fragmentation showed that DNA laddering cannot be used as an early endpoint of the toxicity of Cd. This study provides complementary endpoints that can be used to explore the embryotoxic effects of other chemicals (e.g., pesticides, nanoparticles) with various modes of action ranging from molecular to individual responses in relationship to the concentration of the chemicals to which the embryo is exposed.

III.1.1.5. Acknowledgments

The authors warmly thank Anne-Claude Gabiot-Goydadin and Dominique Rieffel for technical assistance.

III.1.1.6. References

- Agnello, M., Filosto, S., Scudiero, R., Rinaldi, A.M., Roccheri, M.C., 2006. Cadmium accumulation induces apoptosis in *P. Lividus* embryos. *Caryologia* 59, 403–408.
- Ansaldi, M., Nahabedian, D.E., Di Fonzo, C., Wider, E.A., 2009. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1923–1928.
- ATSDR, 1999. Toxicological Profile for Cadmium (Update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- Bandow, C., Weltje, L., 2012. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci. Total Environ.* 435–436, 90–95.
- Barjhoux, I., Baudrimont, M., Morin, B., Landi, L., Gonzalez, P., Cachot, J., 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotox. Environ. Safe.* 79, 272–282.

- Baurand, P.E., Pedrini-Martha, V., Niederwanger, M., Capelli, N., Scheifler, R., de Vaufleury, A., Dallinger, R., 2014. Expression of metallothionein isoforms in embryos of the terrestrial snail *Cantareus aspersus* reveals early life stage adaptation to metal stress. Oral communication at the SETAC EUROPE 24th Annual Meeting, Basel, Switzerland, 11-15 May 2014.
- Baurand, P.-E., De Vaufleury, A., Scheifler, R., Capelli, N., 2013. Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analysis and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9505–9513.
- Caswell, H. 2000. Life Table Response Experiments in ecotoxicology. In *Demography in Ecotoxicology* (eds Kammenga, J.E., Laskowski, R.), pp. 4–56. John Wiley & Sons, Chichester.
- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Xiao, Z., Wang, Q., Dou, S., 2009. Cadmium toxicity to embryonic–larval development and survival in red sea bream *Pagrus major*. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1966–1974.
- Chow, E.S.H., Cheng, S.H., 2003. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. *Toxicol. Sci.* 73, 149–159.
- Creagh, E.M., Sheehan, D., Cotter, T.G., 2000. Heat shock proteins-modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia* 14, 1161–1173.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziger, P., Kagi, J.H.R., 1997. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature* 388, 237–238.
- Druart, C., Scheifler, R., De Vaufleury, A., 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *J. Hazard. Mater.* 184, 26–33.
- Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., De Vaufleury, A., 2012. Landsnail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. *Appl. Soil Ecol.* 53, 56–64.
- Friberg, L., Elinder, C.G., Kjellstrom, T., 1992. Environmental Health Criteria. Cadmium. World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 134.
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Raja, P.V., 2008. Comparison of heavy metal toxicity in life stages (spermioxicity, egg toxicity, embryotoxicity and larval toxicity) of *Hydroides elegans*. *Chemosphere* 71, 515–528.
- Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotox. Environ. Safe.* 41, 288–297.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Bio.* 30, 7–17.
- Hispard, F., Schuler, D., De Vaufleury, A., Scheifler, R., Badot, P.-M., Dallinger, R., 2008. Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1533–1542.
- Höckner, M., Stefanon, K., De Vaufleury, A., Monteiro, F., Pérez-Rafael, S., Palacios, O., Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Physiological relevance and contribution to metal balance of specific and non-specific metallothionein isoforms in the garden snail, *Cantareus aspersus*. *Biometals* 24, 1079–1092.
- ISO 15952, 2006. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae), Determination of the effects on growth by soil contamination. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Ismail, A., Yusof, S., 2011. Effect of mercury and cadmium on early life stages of Java medaka (*Oryzias javanicus*): A potential tropical test fish. *Marine Poll. Bull.* 63, 347–349.
- Jezierska, B., Ługowska, K., Witeska, M., 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 35, 625–640.
- Khangarot, B.S., Das, S., 2010. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. *J. Hazard. Mater.* 179, 665–675.
- Laskowski, R., 1997. Estimating fitness costs of pollution in iteroparous invertebrates, in: Straalen, N.M. van, Løkke, H. (Eds.), *Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soil*. Springer US, pp. 305–319.
- Liu, T., Koene, J.M., Dong, X., Fu, R., 2013. Sensitivity of isolated eggs of pond snails: a new method for toxicity assays and risk assessment. *Environ. Monit. Assess.* 185, 4183–4190.

- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Mar. Poll. Bull. 64, 2663–2670.
- Mazur, R., Wagner, A., Zhou, M., 2013. The application of the *Lymnaea stagnalis* embryo-test in the toxicity bioindication of surfactants in fresh waters. Ecol. Indic. 30, 190–195.
- Munley, K.M., Brix, K.V., Panlilio, J., Deforest, D.K., Grosell, M., 2013. Growth inhibition in early life-stage tests predicts full life-cycle toxicity effects of lead in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. Aquat. Toxicol. 128–129, 60–66.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E., 1996. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. Toxicol. App. Pharm. 140, 356–363.
- Sawasdee, B., Köhler, H.-R., 2009. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). Chemosphere 75, 1539–1547.
- Schirling, M., Bohlen, A., Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 2006. An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. Chemosphere 64, 1730–1738.
- Thévenod, F., 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? Toxicol. Appl. Pharm. 238, 221–239.
- Thompson, J., Bannigan, J., 2008. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. Reprod. Toxicol. 25, 304–315.

III.1.2. Résultats complémentaires

Afin de déterminer si les paramètres de mesure des effets physiologiques mis au point sur les embryons d'escargots avec le Cd à une concentration forte de 6 mg/L pouvaient être applicables à d'autres concentrations d'expositions et à d'autres contaminants, nous les avons utilisé durant des expositions avec d'autres concentrations de Cd ou de Cu sous forme de BB.

Des expositions continues des œufs à 40 µg/L et 4 mg/L de Cd (cette dernière concentration correspondant à la EC_{50-éclosion}) ont été réalisées ainsi qu'à 0,5 g/L de Cu (concentration correspondant à la EC_{25-éclosion}) sous forme de BB (soit 2,5 g/L de BB à 20% de Cu). Des données complémentaires sur l'accumulation du Cd dans les œufs exposés à 40 µg/L et 4 mg/L sont également présentées.

III.1.2.1. Utilisations des paramètres de mesure lors d'expositions continues à différentes concentrations de Cd et Cu

La Figure III-6 présente les mesures de battements cardiaques au jour 7 chez les embryons exposés en continu à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd ainsi qu'à 0,5 g/L de Cu contenu dans de la BB.

La Figure III-7 présente le poids frais des jeunes éclos aux environs du jour 20 mesurée en fin d'exposition continue à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd ainsi qu'à 0,5 g/L de Cu contenu dans de la BB.

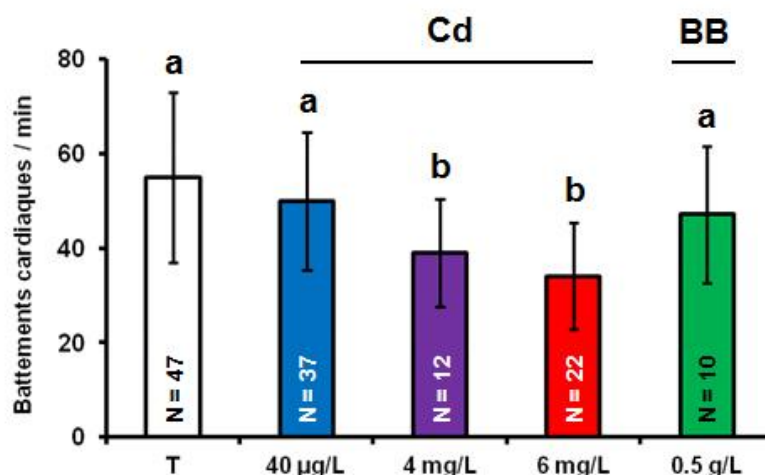


Figure III-6 : Battements cardiaques par minute chez des embryons de 7 jours exposés en continu à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd ainsi qu'à 0,5 g/L de Cu (Bouillie Bordelaise).

T : groupe témoin, BB : Bouillie Bordelaise, a, b : différences significatives entre groupe (test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$)

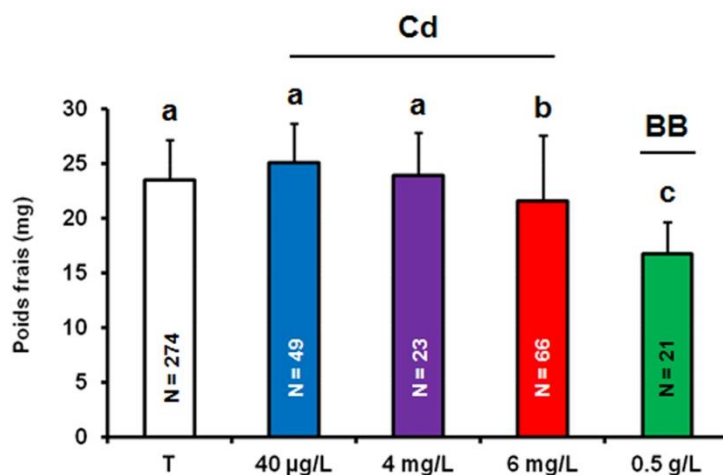


Figure III-7 : Poids frais des jeunes éclos (20 jours) en mg après une exposition continue à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd ainsi qu'à 0,5 g/L de Cu (Bouillie Bordelaise).

T : groupe témoin, BB : Bouillie Bordelaise, a, b, c: différences significatives entre groupes (test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$)

D'après les résultats de la Figure III-6, les battements cardiaques sont diminués par des concentrations en Cd de l'ordre du mg/L alors qu'aucune différence significative des battements par minute n'est détectée après 7 jours d'exposition à 0,5 g/L de Cu. Par rapport au groupe témoin, le poids des jeunes éclos en fin d'exposition est plus faible chez les embryons exposés à 6 mg/L de Cd alors qu'aucune différence significative n'est observée chez les embryons exposés à 40 µg/L et 4 mg/L de Cd. Les embryons éclos exposés à la BB ont un poids frais significativement plus faible que les témoins et que les exposés à 6 mg/L de Cd (Figure III-7).

Le Tableau III-2 synthétise les résultats obtenus et tous les paramètres suivis pendant l'ensemble des expositions au Cd et à la BB.

Tableau III-2 : Résumé des paramètres d'effets suivis lors d'expositions continues au Cd et à la Bouille Bordelaise.

NS : différences non significatives ; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; J3 à J19 : jours 3 à 19. Pour 4 mg/L de Cd la taille des embryons à J10 n'a pas été mesurée.

	PÉRIMÈTRE		COEUR	TAILLE	MASSE FRAÎCHE	ÉCLOSION	
	J 3	J 6	J 7	J 10	J 15 à 19	Délais	Succès
Cd 40 µg/L	NS	NS	NS	NS	NS	aucun	NS
Cd 4 mg/L	NS	NS	*	X	NS	aucun	NS
Cd 6 mg/L	NS	NS	***	***	***	4 jours***	***
BB 0.5 g/L Cu	NS	NS	NS	NS	***	aucun	NS

III.1.2.2. Accumulation du Cd dans les œufs exposés à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L

La Figure III-8 donnent les concentrations mesurées dans les œufs à J3, J6, J10, J15 et J20 durant des expositions continues à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd.

Les concentrations mesurées dans les œufs exposés à 4 et 6 mg/L sont significativement plus élevées que celles mesurées chez les témoins ou chez les exposés à 40 µg/L (KW = 41,6, df = 3, $p < 0,001$; suivi du test de comparaison multiple). Pour une concentration d'exposition donnée, aucune différence significative entre les concentrations de Cd des œufs entre 3 et 20 jours n'a été mise en évidence (KW = 6,6 ; 2,8 ; 2,4 respectivement pour 40 µg/L, 4 et 6 mg/L ; df = 4 ; $p > 0,15$).

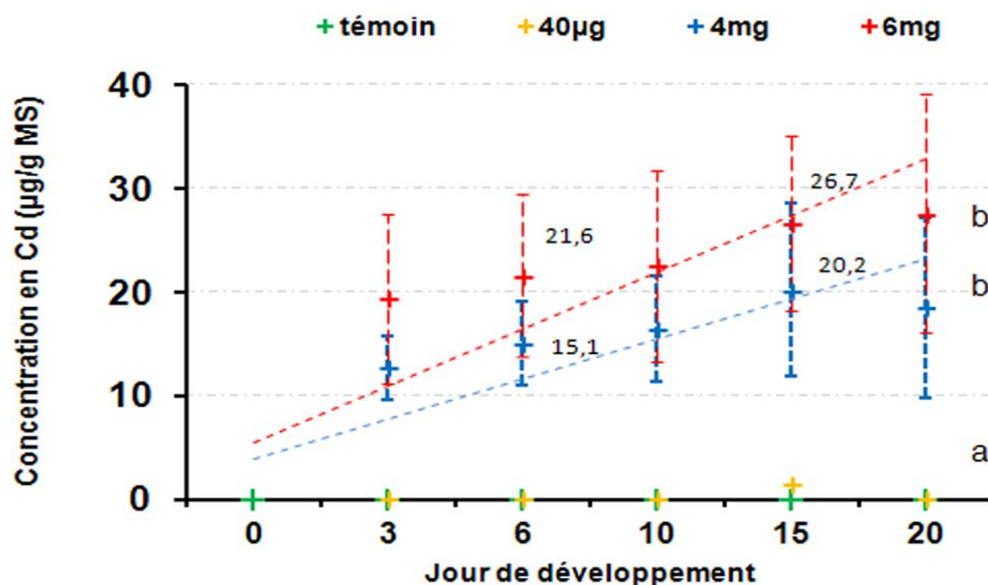


Figure III-8 : Concentrations en Cd d'œufs exposés de façon continue à des concentrations nominales de 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd.

Pour chaque point de mesure $n = 3$ excepté les dosages à 40 µg/L et données à J20 où $n = 2$. Les points représentés sur le graphique représentent la valeur moyenne. a, b : différences significatives entre les valeurs mesurées pour chaque concentration d'exposition (test de rang de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple associé).

III.1.3. Résumé du chapitre 1

- Aucun effet toxique du Cd sur les embryons n'est détectable avant 7 jours d'exposition à 6 mg/L.
- Les premiers effets embryotoxiques sont détectés chez les embryons exposés à partir de 7 jours avec des effets négatifs sur le rythme cardiaque, la croissance et l'éclosion.
- Après 17 jours les embryons non éclos présentent des signes évidents de mort (décomposition) et de malformation.
- Les concentrations en Cd mesurées dans les œufs entiers restent stables du jour 3 au jour 20 pour une même concentration d'exposition.
- Certains des nouveaux paramètres de mesure mis au point pour l'analyse des effets au niveau physiologique peuvent être appliqués pour l'évaluation des effets embryotoxiques à des concentrations proches de la EC_{50} pour le Cd et proche de la EC_{25} pour la Bouillie Bordelaise.

III.2. CHAPITRE 2 Embryogénotoxicité des contaminants chez l'escargot

Ce chapitre est composé de 2 publications scientifiques rédigées en anglais dont une acceptée et une en préparation.

III.2.1. Coupling of Random Amplified Polymorphic DNA Profiles Analysis and High Resolution Capillary Electrophoresis System for the Assessment of Chemical Genotoxicity

Cette partie a fait l'objet d'une publication acceptée en Juillet 2013 dans la revue *Environmental Science and Technology*. Elle porte sur la mise en place de la méthode RAPD sur le modèle d'étude retenu pour cette thèse et le couplage de cette technique avec un système d'électrophorèse capillaire haute résolution. Les auteurs sont Pierre-Emmanuel Baurand, Annette de Vaufleury, Renaud Scheifler et Nicolas Capelli.

Résumé

La technique Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) est dérivée de la Polymerase Chain Reaction (PCR). Elle a le potentiel de détecter un large éventail de dommages à l'ADN. Initialement, cette méthode a été utilisée pour détecter le polymorphisme lors d'études phylogénétiques et plus récemment lors d'études de génotoxicité. Son principe repose sur l'analyse par électrophorèse des profils correspondant aux différents fragments obtenus après amplification aléatoire par PCR d'ADN génomique. Cependant la phase de lecture ces profils reste perfectible car elle est souvent dépendante de l'observateur ou encore de la qualité des images analysées. Le but de notre étude est de proposer un nouvel outil couplant la technique RAPD-PCR et un système d'électrophorèse capillaire haute résolution (SHR) afin d'améliorer les étapes de séparation des produits RAPD et d'analyse de ces profils. Afin de valider notre méthode, nous avons choisi d'évaluer le potentiel génotoxique du cadmium chez des embryons d'escargot terrestre *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus*). Des œufs d'escargot ont été exposés à des solutions de Cd (2, 4 et 6 mg/L) au début de leur développement embryonnaire. Par comparaison avec la méthode d'électrophorèse classique sur gel d'agarose, le SHR permet d'améliorer la qualité des images et la résolution des profils obtenus, de diminuer le temps de migration des échantillons. De plus, après paramétrage du logiciel intégré au SHR, l'analyse des profils peut être automatisée et ainsi permettre de

réduire la subjectivité existante lors de la lecture des profils avec la méthode classique. L'analyse des produits RAPD via SHR a montré des différences dans les profils d'amplicons d'embryons exposés et non-exposés à partir de 2 mg/L de Cd. Ces modifications au niveau génomique révèlent un effet génotoxique du Cd sur les stades embryonnaires de l'escargot. Notre étude démontre l'intérêt du couplage RAPD-SHR qui semble un outil prometteur pour un dépistage haut débit rapide et plus efficace des effets des contaminants chimiques sur l'ADN.


Mots clés : *Helix aspersa*, escargots, embryotoxicité, cadmium

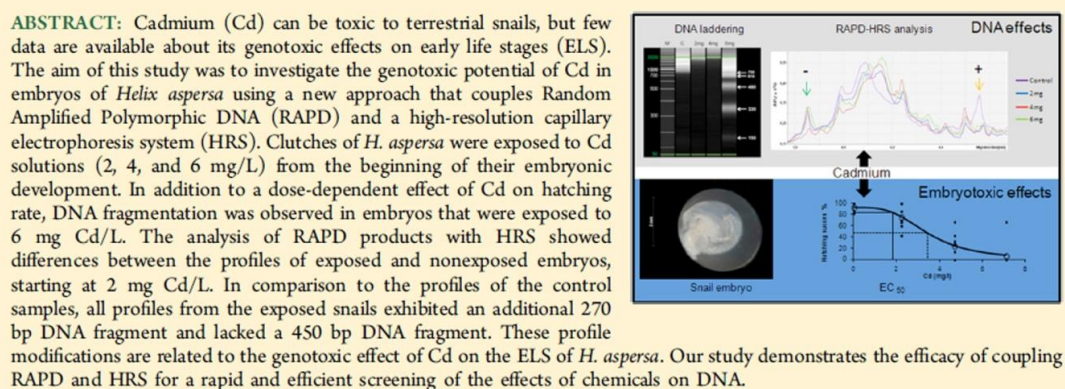
Coupling of Random Amplified Polymorphic DNA Profiles Analysis and High Resolution Capillary Electrophoresis System for the Assessment of Chemical Genotoxicity

Pierre-Emmanuel Baurand,[†] Annette de Vaulleury,^{†,‡} Renaud Scheifler,[†] and Nicolas Capelli^{†,*}

[†]Chrono-Environment, UMR 6249, University of Franche-Comté/CNRS, Place Leclerc, 25000 Besançon, France

[‡]Department of Health Safety Environment, Avenue des Rives du Lac, BP179, 70003 Vesoul cedex, France

 Supporting Information



III.2.1.1. Introduction

Since embryonic development determines hatching success and, contributes to the dynamic nature of populations, embryotoxicity bioassays have become important tools for environmental hazard risk assessments. During the last 20 years, most of the standardized biological methods have involved aquatic organisms such as zebrafish *Danio rerio* (Hallare et al., 2006 ; Osterauer et al., 2011 ; ISO 12980 ; ISO 15088) or oyster embryos (Geffard et al., 2002 ; XP T90-382). Less data are available concerning the early life stages (ELS) of terrestrial organisms such as soil invertebrates. Among them, landsnails, which are mainly phytophagous and detritivorous organisms living at the soil-plant-air interface, have already been used for ecotoxicological purposes at various life stages. Juvenile or adult *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus*) have been used in field studies to assess the bioavailability of metals on contaminated sites (Fritsch et al., 2011) as well as laboratory experiments to study cadmium (Cd) bioaccumulation (Scheifler et al., 2002) and Cd toxic effect on survival, growth, and reproduction (Gomot, 1997 ; Gomot-de Vaufleury and Kerhoas, 2000 ; ISO 15952). Recently, bioassays that use *H. aspersa* eggs to assess the embryotoxicity of various organic (pesticides) or metallic (Cd) contaminants have been developed (Druart et al., 2010, 2012).

Cd is an environmental pollutant, both in terrestrial than aquatic ecosystems (Herber, 2008). This metal is accumulated by many organisms, including the land snail *H. aspersa* (Hispard et al., 2008), and induces various harmful effects. An increased production of reactive oxygen species (ROS) has been reported in the land snail *Theba pisana* collected from urban metal polluted sites showing increased concentrations of Cd, Cu, Pb, and Zn (Radwan et al., 2010). Cd has been recognized as a mutagenic, teratogenic, and embryotoxic agent in the apple snail *Marisa cornuarietis* (Schirling et al., 2006). In addition, some data on Cd toxicity are available for marine organisms. For instance, there are data regarding the ability of Cd to induce the expression of a set of stress proteins (Heat Shock Proteins) in sea urchin embryos *Paracentrotus lividus* (Roccheri et al., 2004). Recently, embryotoxic and genotoxic effects of Cd on the ELS of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, when exposed at environmentally relevant concentrations, have been reported (Mai et al., 2012). Such effects have not been studied in terrestrial molluscs, whose eggs are exposed quite differently than eggs of aquatic invertebrates. Until now, the toxicity of Cd has been demonstrated on the hatching success of *H. aspersa*, and abnormalities or delays in the development of exposed eggs have been described (Druart et al., 2010). However, it is still unknown whether genotoxic effects are involved. Generally, the eventual genotoxicity of chemicals is studied using the comet assay, which allows for the specific detection of DNA breakages, often on

whole nuclei extracted from blood cells. This method has been applied, for example, on coelomocytes of earthworm species (Fourie et al., 2007), on the aquatic mollusc *Littorina littorea* (Noventa et al., 2011) and on embryos of *C. gigas* (Mai et al., 2012) or *M. cornuarietis* (Osterauer et al., 2011), or even on fish embryos such as the *Japanese medaka* (Morin et al., 2011). The advantage of the comet method is that it provides a quantitative approach to genotoxicity at the cellular level. Data obtained using isolated cells from ELS, however, are sometimes criticized (Jha, 2008) because the treatments (e.g., enzymatic, thermic) used for the dissociation of cells can damage DNA material and induce misinterpretations of the comet test results. Another assay, now recognized as one of the most successful to detect genotoxic carcinogens, is the micronucleus test. However, this assay is tricky when working with embryos because isolated cells in division are required to show chromosomal aberrations (Jha, 2004).

For 10 years, the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR technique has been used to study potential damages in DNA extracts from the whole organism (Atienzar et al., 2000 ; Purohit et al., 2003 ; Rocco et al., 2012). Initially, this method was used to detect polymorphisms in taxonomy and phylogenetic studies (Atienzar and Jha, 2006). RAPD-PCR has the potential to detect a wide range of DNA damages (e.g., DNA adducts, DNA breakage) and mutations (e.g., insertions, rearrangements, deletions). RAPD reactions are performed with a single arbitrary short primer (8-12 nucleotides), and after PCR, the amplified fragments are visualized using agarose gel electrophoresis (De Wolf et al., 2004). One of the main advantages of this method is that no prior knowledge of the genome is necessary (Atienzar and Jha, 2006). This point could be of great importance in experiments with non-model species with little genomic information. RAPD requires only small quantities of DNA and can be considered an efficient method for preliminarily screening populations of genotoxic effects (De Wolf et al., 2004).

RAPD has been used in different studies in ecotoxicology to analyze the genotoxicity of pharmaceutical substances (Rocco et al., 2010, 2011, 2012) or to investigate the effects of Cd and methyl mercury (Cambier et al., 2010, 2012) on the model species zebrafish. Except in plants (Cenkci et al., 2009), examples of using RAPD are rare; as far as we know, this method has never been applied to study the embryogenotoxicity of chemicals in terrestrial invertebrates. For an accurate use of RAPD analysis, an important step is the final visualization of RAPD products after agarose gel electrophoresis and the subsequent comparison of the DNA profiles of controls *versus* exposed organisms (De Wolf et al., 2004). Cambier et al. (2010) developed a method for analyzing profiles using qPCR and a melting curve of RAPD products instead of an agarose gel electrophoresis and band pattern analysis

because the latter approach makes it difficult to interpret the faint differences between control and contaminated DNA at low toxicant doses. However, Cambier et al., (2010) also stated that the resolution between bands in an agarose gel is higher than that in melting curves. The conventional systems currently used for the analysis of profiles are mainly visual and may sometimes be subjective and observer-dependent. Thus, we aimed to improve the RAPD profile analysis by proposing a new method that would give an accurate analysis of RAPD products. For this purpose, a new high-resolution capillary electrophoresis system (HRS) has been used in the present work. This approach involves performing the electrophoresis of samples followed by automatized analyses of product migration. Recent studies have used this HRS in different contexts, e.g., to detect signs of DNA fragmentation in human blood samples (Hughes-Stamm et al., 2011), for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* (McMurray et al., 2010), or even for the identification of parasitoids in agricultural systems (Macfadyen et al., 2009). Only one publication coupling HRS and RAPD for quality control of food is currently available (Wu et al., 2012). To our knowledge, coupling RAPD-PCR and HRS has never been utilized to study the genotoxicity of chemicals.

The aims of our study were to investigate the genotoxic effects of Cd in land snail embryos *H. aspersa* using RAPD-PCR and to evaluate the efficiency of an HRS for RAPD products profile analysis.

III.2.1.2. Materials and Methods

Chemicals

Aqueous solutions of Cd were prepared using solid CdCl₂ (99.99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; C-2544). All dilutions were prepared with demineralized water (pH 6.2), which was also used as a control solution. The range of nominal exposure concentrations of Cd (0, 2, 4, and 6 mg Cd/L) was chosen to surround the EC₅₀ (3.9 mg Cd/L) value found by Druart et al. (2010). The concentrations of Cd were measured using ICP-AES (ICAP 6000 series model radial, Thermo scientific, France). The quality of the results was verified using a certified reference water (Hard Drink Water, ERM- CAO11a, Molsheim, France) Cd-certified at 4.94 µg/L (+/- 0.23 µg/L, average recovery of 93%). The actual verified concentrations were, respectively, 2.2, 4.7, and 7.1 mg Cd/L.

Eggs and exposure device

Eggs were obtained from our standardized laboratory rearing and were exposed using a liquid phase bioassay as previously described (Druart et al., 2010, 2012). Ten clutches were used. Each clutch was separated into groups of 6–9 eggs, which were placed in Petri dishes on

four layers of paper (Quantitative filter paper grade 1 ashless, Whatman) dampened with 0.8 mL of control or Cd solutions. Eggs were exposed rapidly after egg-laying, a maximum of 24 h after fertilization, which corresponds to the 1–8 cell stage (Figure III-9 :A and B). Twenty days after the beginning of the exposure (to avoid omitting late hatchlings), the mean hatching success for each concentration was calculated. The results were considered valid if the hatching success of controls was at least of 70% (the average value observed in our laboratory rearing for controls). Each Petri dish was then kept at -80°C until DNA extractions were performed.

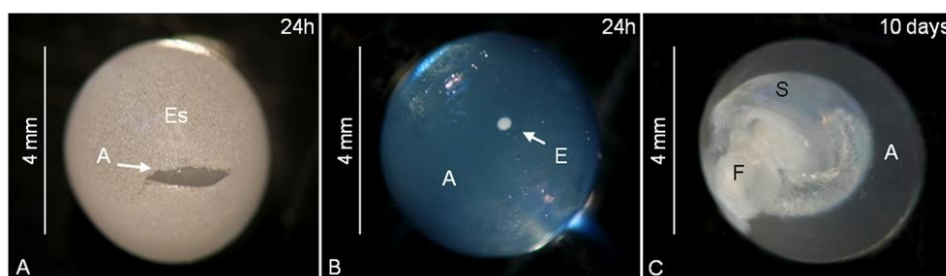


Figure III-9 : Visualization of embryos: eggs with or without eggshell.

(A) Entire snail egg, (B) Egg aged 24 h maximum in albumen (stage: 2 cells), (C) Embryo aged 10 days in albumen. Legend: A: albumen, Es: eggshell, S: shell, F: foot, E: embryo.

DNA extraction

After exposure, DNA isolations were performed on 2 clutches from the 10 used for the Cd exposure. DNA was extracted from eggs at each Cd concentration (i.e., 4 concentrations for 2 clutches and, thus, 8 DNA extracts). To optimize the RAPD technique, the genomic DNA of 5 other unexposed, freshly hatched clutches (which serve as reference samples) was also extracted. Depending on the group (control or exposed to 2, 4, or 6 mg Cd/L), between 10 and 30 mg of biological material was used. Due to low hatching success in the group exposed to 6 mg Cd/L, this material consisted of both hatched embryos and non-hatched eggs (without albumen). Extractions were performed on defrosted embryos using the DNeasy[®] Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with the addition of RNase A (100 mg/mL) in the extraction buffer. DNA samples were kept at -20 °C until RAPD amplifications were performed. The concentrations of the purified genomic DNA were measured at 260 nm, and the purity was estimated by measuring the 260/280 nm absorbance ratio with a Nanodrop Spectrophotometer (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). DNA concentrations of the 150 µL samples obtained after the elution step were between 20 and 130 ng/µL. The 260/280 nm ratio was between 1.65 and 1.85. The quality of DNA samples was checked on 2% agarose gels stained with

ethidium bromide (EtBr), and a comparison with the HRS using the OM1200 method (with standard parameters) was conducted.

RAPD-PCR procedure

RAPD was performed using the PuRe Taq Ready-To-Go PCR beads kit (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). For each reaction, we added one bead of the kit (containing dNTPs, BSA and the polymerase AmpliTaq™), 40 ng of DNA, 5 µL of random primer (5 pmol/µL) and ultra-pure water, for a final volume of 25 µL. The optimal template concentration for the RAPD reaction was determined by testing several amounts of genomic DNA. Then, a screening of 16 decamer primers (Supporting Information Table S1) was performed on the 5 control clutches that were used as references to obtain amplification products with a reasonable number of distinct bands and a good reproducibility. Finally, the RAPD reactions were performed on genomic DNA extracted from samples exposed to various Cd concentrations with the selected primers. Each RAPD reaction was performed twice on each DNA extract. Amplification reactions were performed in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France) as follows: one initial denaturation step of 5 min at 95 °C followed by 45 cycles at 95 °C for 1 min (denaturation), 36 °C for 1 min (annealing), and 72 °C for 2 min (extension). The RAPD reaction products were stored at -20 °C prior to use.

Micro capillary electrophoresis and RAPD profile analysis

RAPD profiles have been analyzed via capillary electrophoresis using a QIAxcel system (<http://www.qiagen.com/products/qiaxcelsystem.aspx#Tabs=t1>). This system allows an automatic, rapid, and high-resolution migration of the amplification products. The HRS gives a digital gel image and an electropherogram (i.e., a graphic showing the evolution of fluorescence detected during the migration) for fragment analysis. We chose to use the OM500 method (separation sample voltage 5 KV) with a time sample injection of 30 s to obtain a better pattern after migration (clear profile with distinct fragments). The size of the amplified fragments was determined automatically by referring to the fragments obtained with the known size marker QX DNA Size Marker 100 bp-2.5 kbp. Next, the data obtained have been analyzed using the biocalculator software of the system. The QIAxcel software gives the option to adjust 5 parameters. Here, we kept the default values for the positive threshold at 5% (a signal exceeding this value of maximal fluorescence is detected as a peak), the baseline filter at 40 s (determination of the baseline detection), the minimum distance at 0.25 s (the distance for considering 2 peak clusters to be 2 distinct peaks), and the suspend integration at 0.5 min (turns off peak detection for the period selected). To obtain a better

definition of the RAPD products after migration, we tested various smoothing filter values (used to resolved two closed peaks). To allow for a robust analysis of control and exposed sample profiles, the fragments/bands with better reproducibility (present in 100% of cases) along the pattern that was revealed after electrophoresis of the RAPD products in the 5 non-exposed clutches were selected. These selected fragments give the reference profile used for subsequent analysis. The size of these reference fragments (in bp) and their tolerance (in % of bp) were set in the biocalculator software of the HRS. It allows using the binary peak function to automatize fragment detection during profile comparison. The software produces a binary matrix of results, where the presence (1) or absence (0) of the reference bands in the amplification patterns is noted. Digital gel images and electropherograms are used to visually confirm the results given by the binary function. For the detection of new amplified fragments, we first visualized the gel images of RAPD performed in one clutch (1 non-exposed and 3 Cd-exposed samples). Then, we superposed the electropherogram(s) obtained on the electropherogram of the reference profile. If a new fragment is detected after the superposition, parameters of this new peak are entered in the biocalculator software. After reparameterization, the completed/revised reference profile is used to analyze the presence of this new fragment in all exposed samples. To detect the loss of fragments along profiles, each of the RAPD profiles was analyzed after programming the parameters in the binary peak function. The analysis of control *versus* exposed profiles was performed on 4 RAPD profiles for each Cd concentration, i.e., a total of 16 RAPD profiles (2 clutches x 4 Cd concentrations x 2 RAPD profiles for each DNA extract).

Statistical analyses

The null hypothesis of independence between Cd exposure and hatching success was tested using the Kruskal–Wallis rank test. When this hypothesis was rejected, multiple comparisons were performed on ranks using Tukey’s Honestly Significant Difference test. All statistics were performed with R (2.13.2) (R Development Core Team, 2004, <http://www.R-project.org/>). The dose-dependent curves and the EC₁₀ and EC₅₀ values were determined with the Hill’s model using the macro Excel Regtox free version EV6.1.

III.2.1.3. Results

Hatching success

The EC₁₀ and EC₅₀ values for eggs exposed at the 1–8 cell stage were 1.83 mg/L (Confidence interval (CI) 95%: 1.28–3.76) and 3.47 mg/L (CI 95%: 2.91–4.51) of Cd, respectively. The hatchability of snail eggs exposed rapidly after the end of egg laying is not

significantly reduced at 2.2 mg/L (NOEC) compared to the control. From 4.7 mg/L Cd (LOEC), however, the effect on hatchability is statistically significant.

Genomic DNA analysis

Total DNA isolated from controls and from eggs exposed to 2 and 4 mg/L Cd was of high molecular weight (greater than 23 kpb) and unfragmented (Figure III-10A and B). In contrast, the electrophoresis of DNA extracts reveals an internucleosomal fragmentation (DNA laddering) at 6 mg Cd/L. First, the samples were visualized with conventional agarose gel electrophoresis (Figure III-10A) and with the HRS (Figure III-10B). The HRS-electropherogram provides a detailed picture of the fragmentation and reveals 5 peaks of 150, 330, 480, 610, and 700 bp (Figure III-10B and C) in eggs exposed to 6 mg/L Cd. For the controls, 2 mg Cd/L, and 4 mg Cd/L, no peaks are visible.

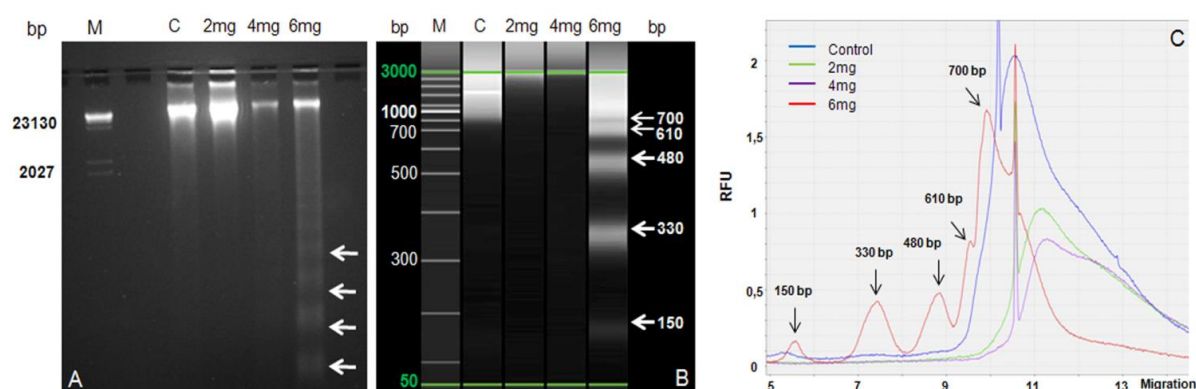


Figure III-10 : The genomic DNA pattern of snails' eggs exposed to Cd (0-24 h after fertilization)

after a conventional agarose gel electrophoresis (A) or a High Resolution System (B and C).

C: control, 2 mg, 4 mg and 6 mg: snails exposed to 2, 4, 6 mg Cd/L, respectively. (A) M: Lambda DNA Hind III marker; Genomic bands for C, 2 mg, and 4 mg showed the same size, approximately 23 kbp. (B) M: Marker 100 bp-2.5 kbp; DNA pattern between 50 and 3000 bp obtained using the same samples with the HRS. White arrows show the 5 fragments detected. (C) HRS-electropherograms obtained with HRS. Each curve represents the variation of fluorescence (in RFU: Relative Fluorescence Units) detected by the biocalculator of the HRS as a function of migration time.

RAPD

After testing 3 amounts of DNA template (4, 40, and 400 ng) with the primer Essam-08 (Tableau III-3) in the RAPD reaction, 40 ng was found to be the best quantity to obtain a clear and distinct profile. A comparison of the RAPD products of non-exposed eggs using the classic and HRS methods shows that HRS provides the clearest profile with more distinct bands (Figure III-11).

Tableau III-3 : Sequences of primers used in the RAPD-PCR amplification of *Helix aspersa* embryos' genomic DNA.* Kit RTG; ^A Armbruster et al. 2007; ^B Gutierrez et al. 2003; ^C Bin Dajem et al. 2011.

Primers	Sequence	Primers	Sequence
P1 *	5'-GGTGCGGGAA-3'	H19 ^A	5'-CTGACCAGCC-3'
P2 *	5'-GTTTCGCTCC-3'	X19 ^A	5'-CCACCGCCAG-3'
P3 *	5'-GTAGACCCGT-3'	OPA-02 ^B	5'-TGCCGAGCTG-3'
P4 *	5'-AAGAGCCCGT-3'	OPB-08 ^B	5'-GTCCACACGG-3'
P5 *	5'-AACGCGCAAC-3'	OPG-05 ^B	5'-CTGAGACGGA-3'
P6 *	5'-CCCGTCAGCA-3'	OPG17 ^B	5'-ACGACCGACA-3'
H18 ^A	5'-GAATCGGCCA-3'	Saad-2 ^C	5'-GTGCTACGTC-3'
Osama-5 ^C	5'-GACCATCGTC-3'	Essam-08 ^C	5'-GCTCGAACTT-3'

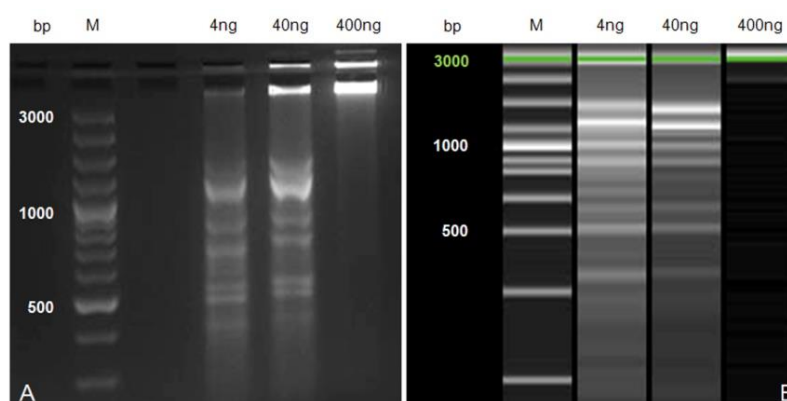


Figure III-11 : Electrophoresis pattern of RAPD products obtained using the Essam-08 primer of DNA of unexposed *Helix aspersa* eggs.

Comparison of the conventional gel electrophoresis method (A) and HRS (B). M: Size marker in bp (100 bp Plus DNA Ladder); 4, 40 and 400 ng: quantities of template tested.

Selection of HRS analysis parameters and analysis of reference profiles

The smoothing filter value retained was 0 point, as it provides better definition. The default values for the other parameters provided the best compromise to detect a reasonable number of peaks in all samples and to minimize the background noise. These values were the same for all comparisons performed with the HRS.

Two of the 16 primers tested were selected to validate the feasibility of the method in our experimental conditions: OPG17 and X19 (Tableau III-3). These 2 primers provided amplification products with a strong reproducibility among DNA of the 5 non-exposed clutches tested. For amplification with OPG17 (Figure III-12A and C), the pattern obtained showed 4 reproducible fragments from 300 to 500 bp, whereas the X19 pattern showed 5 fragments from 550 bp to 1000 bp (Figure III-12B and D). For the primer OPG17, the 4 fragments were called B1 to B4 and were selected to automatize the profile analysis (Figure

III-12C). For the primer X19, the 5 fragments were called B1 to B5 and were selected for the automatized profile analysis (Figure III-12D). Next, the binary peak function parameters were memorized in the software. For each peak obtained, the mean size and tolerance in % were entered. For the peaks of the OPG17 primer, the tolerance was 2% for the 300, 360, and 450 bp fragments and 1.5% for the 320 bp product. For the peaks of the X19 control profiles, the size and tolerance (in brackets) of the B1 to B5 fragments were 544 bp (1.5%), 580 bp (1.8%), 726 bp (2.1%), 852 bp (4.7%), and 1053 bp (2.8%), respectively.

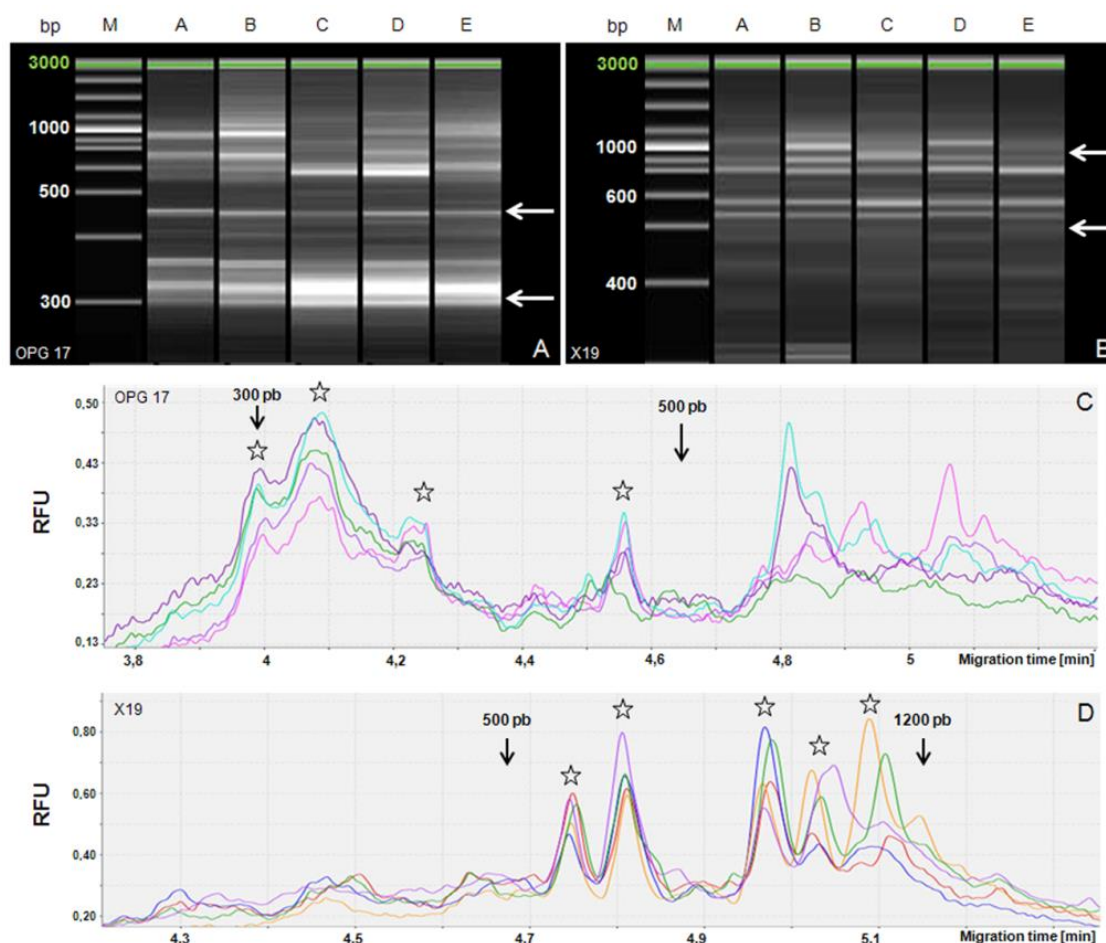


Figure III-12 : Comparison of RAPD profiles and electropherograms obtained with the primer OPG17 (A and C) and with the primer X19 (B and D) used on DNA from 5 controls as a reference (A to E). M: Marker 100 bp-2.5 kbp. Sizes of fragment are given in base pairs (bp). The white arrows surround the similar pattern obtained. (C) and (D) Each curve represents the variation of fluorescence (in Relative Fluorescence Units) detected by the HRS as a function of migration time. Similar variations with common distinct bands are visible between black arrows. (C) Stars represent the 4 peaks retained for the profile analysis with the primer OPG17 (300, 320, 360 and 450 bp, from left to right). (D) Stars represent the 5 peaks retained for the profile analysis with the primer X19 (approximately 540, 578, 720, 850 and 1050 bp, from left to right).

Comparison of RAPD profiles of control and exposed eggs

The 2 RAPD performed on a same extract demonstrated the reproducibility of analyzed DNA bands (data not showed). For Cd-exposed samples, the RAPD profiles amplified with OPG17 showed changes in comparison to controls. The 3 selected bands (B1 to B3) were always detected (Figure III-13B, B1 to B3 arrows on the electropherograms). Band 4 was only present in the control profiles (Figure III-13A, box B4) and on the electropherograms (Figure III-13B, peak shown by arrow B4). Band B0 was detected in the 3 Cd-exposed samples, but not in the control sample (Figure III-13A, box B0; Figure III-13B, peak B0). These results were confirmed by the binary matrix of detection (Figure III-13C). For the RAPD profiles obtained with the X19 primer, no changes in the genomic DNA were detected (Figure III-14A, B and C).

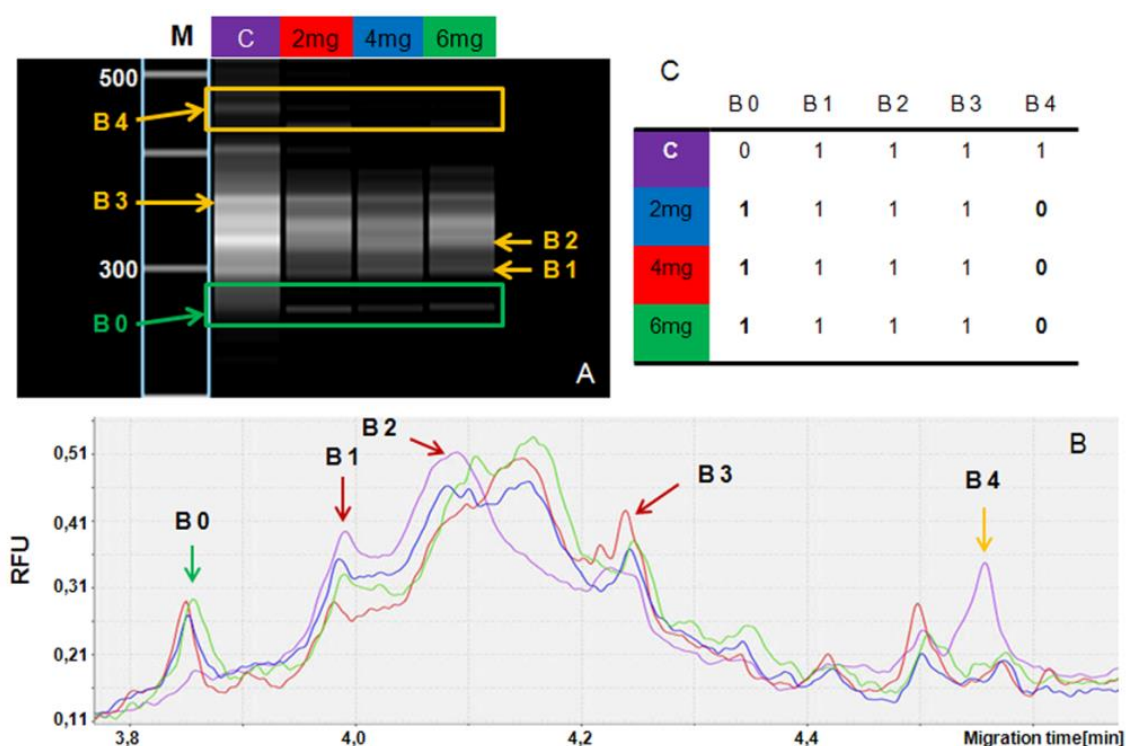


Figure III-13 : Gel image (A), electropherograms (B) and binary matrix (C) of RAPD profiles migration obtained with OPG17.

M: size marker 100 bp-2.5 kbp. C: control; 2, 4, 6 mg: Cd-exposed samples at 2, 4 and 6 mg/L. (A) B1 to B4: bands 1 at 4; B0 band 0.

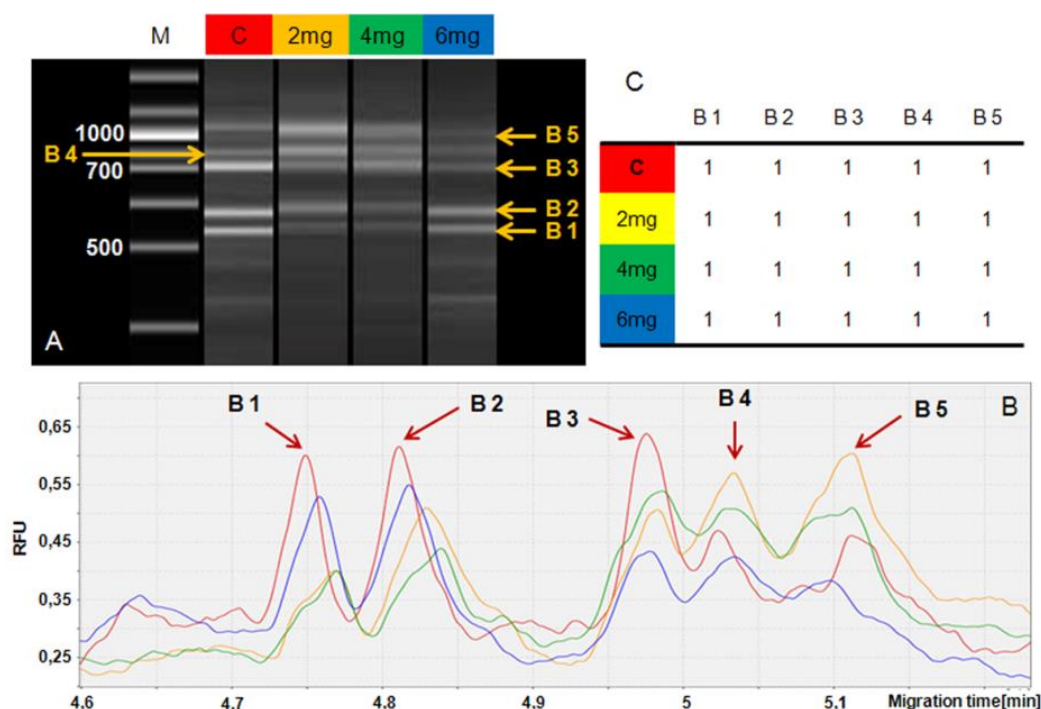


Figure III-14 : RAPD profiles migration obtained with primer X19.

A: Gel image, B: electropherograms, C: binary matrix. M: size marker 100 bp-2.5 kbp. C: control, 2, 4, 6 mg: Cd-exposed samples at 2, 4 and 6 mg/L. (A) and (C): B1 to B5: bands 1 at 5.

III.2.1.4. Discussion

Acute toxicity bioassays using animals are often not well accepted and must respect current animal welfare legislation. Therefore, embryotoxicity testing using eggs that incubate outside of the mother is one of the promising alternatives, at least with fish animal models (Lammer et al., 2009). The fish embryo toxicity assay (FET) using the zebrafish is one of the proposed replacement alternatives to the acute fish test for hazard and risk assessment (Embry et al., 2010). Akagi et al. (2012) confirm that the FET assay emerges as a powerful experimental model in drug discovery and environmental toxicology. For terrestrial organisms, the development and validation of embryotoxicity bioassays are needed to propose such alternative tools. The embryotoxicity test with land snail eggs provided good reproducibility with Cd: indeed the EC_{50} found for the 1–8 cell stage using 10 replicates (3.47 mg Cd/L) is of the same order of magnitude as that found (3.94 mg/L) by Druart et al. (2010). The use of Cd as a known genotoxic agent constitutes a possible positive control to detect the embryo and genotoxic effects of chemicals. Other physical or chemical agents, which are safer for use in routine analysis (e.g., Osterauer et al. (2011) show that UV or H_2O_2 are efficient positive genotoxic agents), could also constitute reference genotoxic stressors but remain to be tested in our conditions. Sublethal effects of Cd on hatchability of the apple snail embryos *M. cornuarietis* were observed at 250 μ g/L (Schirling et al., 2006). The lower sensitivity of *H. aspersa* to Cd may result from a specific response and/or the nature of the

exposure, with the eggs of aquatic gastropods being completely and continuously immersed by contaminated liquid, whereas those of terrestrial snails are not. Differences in the composition of the material surrounding the embryos (egg capsules and albumen) may modulate the mobility of Cd from the environment to the embryos and may thus also explain the differences in sensitivity between organisms.

This study is the first one, to our knowledge, that uses various molecular approaches (i.e., an analysis of genomic DNA and RAPD-PCR) to screen the effect of Cd on the ELS of a terrestrial land snail. DNA fragmentation was detected in *H. aspersa* embryos exposed to the highest Cd concentration (6 mg Cd/L). Such elevated concentrations are close to the EC₅₀-hatchability and can be found in industrial effluents, as reported by Lokhande et al. (2012), who found Cd concentrations of up to 28 mg Cd/L in such wastes. The DNA laddering pattern (internucleosomal fragmentation of DNA) observed is characteristic of apoptosis, a type of programmed cell death (PCD). We found that analysis of DNA profiles with HRS provided a more precise determination of the size of ladders/fragments than the conventional agarose gel electrophoresis method (Figure III-10).

The present study is the first to report genotoxic effects based on RAPD-PCR coupled with HRS analysis. RAPD has already been used successfully in different ecotoxicological contexts to demonstrate the genotoxic potential of various physical and chemical stressors: nanoparticles ZnO and CeO₂ on soybean *Glycine max* (López-Moreno et al., 2010), organic compounds on the zebrafish *D. rerio* (Rocco et al., 2011, 2012 ; Zhiyi and Haowen, 2004), mercury, boron, chromium, and zinc on the common bean *Phaseolus vulgaris* (Cenkci et al., 2009), arsenic on rice *Oryza sativa* (Ahmad et al., 2012), and copper on *Daphnia magna* (Atienzar et al., 2001). In plants, the genotoxicity of Cd has mainly been studied with RAPD in *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 2012), *Hydrilla verticillata*, and *Ceratophyllum demersum* (Gupta and Sarin, 2009). Only a few studies used RAPD-PCR on the ELS of animals: Hagger et al. (2005) have used it on mussel embryos exposed to a range of concentrations (0.37–370 kBq/mL) of tritiated water. Using this method, the genotoxic effect of Cd was studied in the zebrafish (Cambier et al., 2010 ; Orioux et al., 2011), but not in the embryos of other animals. The exposure of *H. aspersa* embryos to Cd confirms the reliability of RAPD-PCR to investigate the genotoxic potential of chemicals but also provides insight into some limits of this technique as discussed below.

RAPD-PCR coupled with HRS allowed for the detection of DNA profile modification in exposed samples, starting at 2 mg Cd/L. Using the OPG17 primer, the disappearance of an amplified fragment of 450 bp (B4) and the presence of new RAPD products (B0) of 270 bp were found in all Cd-exposed samples (2 to 6 mg/L), compared to the controls. Hagger et al.

(2005) underlined the difficulty in deciphering the mechanisms responsible for the changes detected with the RAPD. In our case, modifications of profiles can be related to 3 types of alterations: point mutations, DNA damages (e.g., adducts, breaks), and complex chromosomal rearrangements for the fragment disappearance (Atienzar and Jha, 2006). The appearance of fragments can reveal changes in oligonucleotide priming sites due to point mutations (new annealing events), large deletions (leading to a new annealing site), and/or to homologous recombination/rearrangements (Atienzar and Jha, 2006 ; Ahmad et al., 2012). This method is a qualitative or a semi-quantitative (as RAPD-PCR-HRS does not support quantifying the number of mutations) that provides evidence of genomic modifications (Atienzar and Jha, 2006). The only way to know the exact part of the genome that has been modified would be to sequence the fragment of interest. However, RAPD is useful if the goal is to perform a preliminary screening of the genotoxicity of chemicals. In our experimental conditions, all of the profiles analyzed after RAPD-PCR for the 4 tested modalities (0, 2, 4, and 6 mg/L Cd) presented the same modifications.

In this study, we found modifications of DNA products with only one of the two primers that we used. Usually, several primers are necessary to screen a large part of genomic DNA. For example, by using 6 primers, Zhiyi and Haowen (2004) detected a genotoxic effect of cyclophosphamide and dimethoate on zebrafish. Using 11 primers, Ahmad et al. (2012) showed an increase in the frequency of band loss in RAPD profiles with the increase of As (III) concentrations in rice *Oryza sativa*. To discriminate signs of genotoxicity between the control and exposed samples, the selected primers must give very reproducible profiles. In our study, the primer OPG17 met these two criteria, but the primer X19 did not because it did not enable differentiating between exposed and control profiles. It must also be stressed that if no profile change is detected, this does not mean that no genotoxic effects occurred; that is why the use of several primers is recommended for RAPD studies. On the basis of the present results, it is possible now to enlarge the number of primers to obtain more information on the response of snail eggs (and other organisms) to Cd and other chemicals.

Coupling DNA laddering detection and RAPD analysis gives complementary information. DNA can be fragmented without a detectable mutation. The results obtained with the primer X19 for the Cd-exposed samples illustrate this situation: no signs of genotoxicity were detected by RAPD, whereas the DNA laddering showed a fragmentation at 6 mg Cd/L. This could be explained by the fact that this primer does not match the fragmented DNA, e.g., if the damaged DNA is an AT-rich region. Because RAPD probes generally present a high GC content and allow for mainly screening the CG-rich part of the genome (De Wolf et al., 2004), the DNA fragment will not be recognized by the selected probe. Apoptotic DNA

fragmentation is characterized by endonuclease activation, which cleaves nuclear DNA between nucleosomes, producing a mix of DNA fragments with periodic length, and forms ladders on gel (Gladish et al., 2006). RAPD gives supplementary data on genotoxic effects based on the appearance or disappearance of DNA bands, which can be caused by various DNA modifications.

HRS shows an interesting potential to improve the analysis of DNA profiles with the help of electropherogram superposition and the biocalculator software. After a parameterizing step, this part of the system is able to automatize the profile analysis. The automatization of the detection of peak fluorescence helps reduce the subjectivity of the profile analysis. Indeed, the analysis is conducted with the parameters of detection entered before the start of the migration of the RAPD products from exposed embryos. The detection of new fragments “gained” in the profiles is more difficult because the reference profile does not include the new fragments. For this part of the analysis, an additional supplementary step of reprogramming the reference profile is necessary to include a “0”, i.e., absence of a peak in the binary matrix (Figure III-13). This additional step is the only way to gain information about the fragment size and to be able to enter its specificities into the biocalculator software. The conventional analysis of profiles obtained with agarose gel electrophoresis is often based on simple visualization of pictures. However, the lack of precision of RAPD-PCR profiles analysis, which is dependent on the quality of the electrophoretic separation and band staining procedures (De Wolf et al., 2004), remains infrequently discussed in the literature.

Coupling RAPD-PCR and HRS presents several advantages. This association decreases problems that can occur during the migration: for example, the system adjusts non-linear migrations due to the difference in the pH of the analyzed samples. Some recent publications present a final picture with an angle of deviance at the end of the migration between 3 and 5° (Liu et al., 2009 ; Zhou et al., 2011). With the HRS, all of the separated fragments are linear, in comparison to the “U” shape that is often obtained in agarose gel electrophoresis. Recently, Wu et al. (2012) coupled the RAPD with a 2100-bioanalyzer to assess the purity of barley. Like the HRS, the bioanalyzer is able to minimize the electrophoresis conditions that are subject to variation, such as gel concentration, temperature, and buffer composition. They reported that this coupling improved inter-assay reproducibility; however, a step involving loading a maximum of 12 samples and reagents in a chip is necessary before the migration. With the HRS system, 12 to 96 samples can migrate for 12 to 90 minutes with a reduced preparation: the products of amplification can be used for migration directly after RAPD-PCR. Atienzar et al. (2000) highlighted the fact that to render new PCR products visible in conventional agarose gel, a minimum of 10% of mutations may be required at the same locus

in a sufficient number of cells. With HRS, this percentage required for detection may decrease because this new system considerably increases the global quality of the migration (e.g., better resolution and separation, linear migration) and decreases the time needed to obtain a picture of electrophoresis, as we have shown, in comparison with a method using a conventional gel. These improvements can directly influence the interpretation of DNA product profiles, especially the determination of the amplified fragments size. Furthermore, the time-consuming steps involving the preparation, polymerization as well as EtBr staining of the agarose gel are no longer needed. As EtBr is a potentially mutagenic agent that must be handled with extreme caution, the limitation of its use in routine analysis is recommended. HRS requires only low quantities of DNA and low volumes of samples ($< 1 \mu\text{L}$ *versus* $20 \mu\text{L}$ generally needed for the conventional method) and, thus, considerably increases the amount of remaining sample available for subsequent analyses.

This study is the first to demonstrate that the embryotoxicity of Cd in terrestrial snails *Helix aspersa* is associated with genomic (DNA fragmentation) and genotoxic effects (i.e., DNA mutations causing the gain and/or loss of RAPD fragments). We could speculate that when a mutation reaches a critical level, apoptosis is induced, leading to DNA fragmentation. RAPD-HRS is adapted to indicate DNA alteration after the selection of adapted probes and parameterization of the reading system. The quantification and identification of the type of DNA damages involved constitute limitations of RAPD-HRS. HRS improved the rapidity and the number of samples analyzed as well as the objectivity of the analysis of RAPD products after an accurate calibration of the biocalculator (this step requires some expertise). This innovative method appears promising for a fast and efficient screening of the effects of chemicals on DNA. The *Helix aspersa* embryotoxicity bioassay, combined with RAPD-PCR-HRS, constitutes a new tool that can help in the REACH directive by providing information on the ecotoxic/genotoxic potential of the numerous chemicals for which such data are still not available.

III.2.1.5. Acknowledgments

The authors warmly thank Julie Durel, Anne-Claude Gabiot-Goydadin, and Dominique Rieffel for technical assistance. We are also grateful to the Regional Council of Franche-Comté and the Ministry of Research, who funded this work.

III.2.1.6. References

- ISO 12890:1999. Détermination de la toxicité vis-à-vis des embryons et larves de poissons d'eau douce. Méthode semi-statique. Qualité de l'eau. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 15952:2006. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae), Determination of the effects on growth by soil contamination. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 15088:2007. Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduaires vis-à-vis des œufs de poisson-zèbre (*Danio rerio*). Qualité de l'eau. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- XP T90-382, 2009. Bio indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux - Détermination de la toxicité potentielle d'échantillons aqueux sur le développement embryon-larvaire de bivalve. Qualité de l'eau. AFNOR (Association Française de Normalisation). La Plaine Saint-Denis Cedex, France.
- Ahmad, M.A., Gaur, R., Gupta, M., 2012. Comparative biochemical and RAPD analysis in two varieties of rice (*Oryza sativa*) under arsenic stress by using various biomarkers. J. Hazard. Mater. 217, 141–148.
- Akagi, J., Khoshmanesh, K., Evans, B., Hall, C.J., Crosier, K.E., Cooper, J.M., Crosier, P.S., Wlodkowic, D., 2012. Miniaturized embryo array for automated trapping, immobilization and microperfusion of zebrafish embryos. PLOS ONE 7, e36630.
- Atienzar, F.A., Cheung, V.V., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. Toxicol. Sci. 59, 241–250.
- Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. Aquat. Toxicol. 50, 1–12.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. Mutat. Res. 613, 76–102.
- Armbruster, G.F.J., Hofer, M., Baur, B., 2007. Effect of cliff connectivity on the genetic population structure of a rock-dwelling land snail species with frequent self-fertilization. Biochem. Syst. Ecol. 35, 325–333.
- Bin Dajem, S.M., Ibrahim, E.H., Al-Quraishy, S.A.S., Mostafa, O.M.S., 2011. Fingerprint of *Biomphalaria arabica*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Saudi Arabia, using RAPD-PCR. Gene 485, 69–72.
- Cambier, S., Gonzalez, P., Durrieu, G., Bourdineaud, J.-P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 312–319.
- Cambier, S., Gonzalez, P., Mesmer-Dudons, N., Brethes, D., Fujimura, M., Bourdineaud, J.-P., 2012. Effects of dietary methylmercury on the zebrafish brain: histological, mitochondrial, and gene transcription analyses. Biometals 25, 165–180.
- Cenkci, S., Yıldız, M., Cigerci, A., Konuk, M., Bozdog, A., 2009. Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Chemosphere 76, 900–906.
- De Wolf, H., Blust, R., Backeljau, T., 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. Mutat. Res. 566, 249–262.
- Druart, C., Scheifler, R., de Vaufléury, A., 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. J. Hazard. Mater. 184, 26–33.
- Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., de Vaufléury, A., 2012. Landsnail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. Appl. Soil Ecol. 53, 56–64.
- Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. Aquat. Toxicol. 97, 79–87.

- Fourie, F., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 361–368.
- Fritsch, C., Cœurassier, M., Giraudoux, P., Raoul, F., Douay, F., Rieffel, D., de Vaufléury, A., Scheifler, R., 2011. Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: Influence of soil contamination and landscape. *PLOS ONE* 6, e20682.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416.
- Gladish, D.K., Xu, J., Niki, T., 2006. Apoptosis-like programmed cell death occurs in procambium and ground meristem of Pea (*Pisum sativum*) root tips exposed to sudden flooding. *Ann. Bot.* 97, 895–902.
- Gomot, A., 1997. Effects of heavy metals on the development of snails: Heavy metal pollution bioindicators for human health. *Bull. Acad. Natl. Med.* 181, 59–75.
- Gomot-de Vaufléury, A., Kerhoas, I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 434–442.
- Gupta, M., Sarin, N.B., 2009. Heavy metal induced DNA changes in aquatic macrophytes: Random amplified polymorphic DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker. *J. Environ. Sci. China* 21, 686–690.
- Gutierrez, A., Pointier, J., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Perez, R., Yong, M., Sanchez, J., Loker, E., Theron, A., 2003. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Exp. Parasitol.* 105, 211–218.
- Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74, 205–217.
- Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 378–388.
- Herber, R.F.M., 2008. Cadmium, in: Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoeppler, M. (Eds.), *Elements and their compounds in the environment*. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 689–708.
- Hispard, F., de Vaufléury, A., Martin, H., Devaux, S., Cosson, R.P., Scheifler, R., Richert, L., Berthelot, A., Badot, P.-M., 2008. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 490–498.
- Hughes-Stamm, S.R., Ashton, K.J., van Daal, A., 2011. Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. *Int. J. Legal Med.* 125, 341–348.
- Jha, A.N., 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 1–17.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 196–209.
- Liu, W., Sun, L., Zhong, M., Zhou, Q., Gong, Z., Li, P., Tai, P., Li, X., 2012. Cadmium-induced DNA damage and mutations in *Arabidopsis* plantlet shoots identified by DNA fingerprinting. *Chemosphere* 89, 1048–1055.
- Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Xie, L.J., Han, Y.P., 2009. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *J. Hazard. Mater.* 161, 878–883.
- López-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J.A., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7315–7320.
- Macfadyen, S., Gibson, R., Raso, L., Sint, D., Traugott, M., Memmott, J., 2009. Parasitoid control of aphids in organic and conventional farming systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 133, 14–18.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670.

- McMurray, C.L., Hardy, K.J., Hawkey, P.M., 2010. Rapid, automated epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Microbiol. Methods 80, 109–111.
- Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. Anal. Bioanal. Chem. 399, 2235–2242.
- Noventa, S., Pavoni, B., Galloway, T.S., 2011. Periwinkle (*Littorina littorea*) as a sentinel species: a field study integrating chemical and biological analyses. Environ. Sci. Technol. 45, 2634–2640.
- Orieux, N., Cambier, S., Gonzalez, P., Morin, B., Adam, C., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.-P., 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 974–983.
- Osterauer, R., Fassbender, C., Braunbeck, T., Köhler, H.-R., 2011. Genotoxicity of platinum in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*). Sci. Total Environ. 409, 2114–2119.
- Purohit, H.I., Raje, D.V., Kapley, A., Padmanabhan, P., Singh, R.N., Purohit, H.J., 2003. Genomics tools in environmental impact assessment. Environ. Sci. Technol. 37, 356A–363A.
- Radwan, M.A., El-Gendy, K.S., Gad, A.F., 2010. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. Chemosphere 79, 40–46.
- Roccheri, M.C., Agnello, M., Bonaventura, R., Matranga, V., 2004. Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos. Biochem. Biophys. Res. Commun. 321, 80–87.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V., 2010. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1530–1536.
- Rocco, L., Izzo, A., Zito, G., Peluso, C., 2011. Genotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to two pharmacological products from an impacted Italian river. J. Environ. Anal. Toxicol. 1, 103.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Zito, G., Archimandritis, A., Peluso, C., Stingo, V., 2012. Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants. Environ. Toxicol. 27, 18–25.
- Lokhande, R.S., Singare, P.U., Pimple, D.S., 2012. Study on physico-chemical parameters of waste water effluents from Taloja industrial area of Mumbai, India. Int. J. Ecosyst. 1, 1–9.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufléury, A., Badot, P.-M., 2002. Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: Bioaccumulation and effects. Ecotoxicol. Environ. Saf. 53, 148–153.
- Schirling, M., Bohlen, A., Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 2006. An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. Chemosphere 64, 1730–1738.
- Wu, Y., Wang, B., Han, J., Zhang, Z., Chen, Y., 2012. RAPD-2100 bio-analyzer and 2DGE methods applied to qualitatively and quantitatively assess grain purity of commercial malting barley. Eur. Food Res. Technol. 234, 381–390.
- Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 96–103.
- Zhou, J., Cai, Z.-H., Xing, K.-Z., 2011. Potential mechanisms of phthalate ester embryotoxicity in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. Environ. Pollut. 159, 1114–1122.

III.2.2. Genotoxicity assessment of pesticides and Cd on terrestrial snail embryos with Random Amplified Polymorphic DNA

Cette seconde partie du chapitre 1 (présentée sous forme d'un projet de publication rédigé en anglais) s'intéresse à la détection d'effets génotoxiques chez l'embryon d'escargot lors d'expositions continues à 3 pesticides (2 organiques et 1 métallique). Une étude cinétique des potentiels effets génotoxiques d'une exposition de 24 heures au Cd a également été réalisée.

Résumé

Aucune donnée n'est disponible concernant la génotoxicité de formulations commerciales de pesticides (Round Up Flash[®] (RU[®]), Corail[®], Bouillie Bordelaise (BB)) chez les embryons d'escargots terrestres. De même la génotoxicité pouvant résulter d'une exposition courte au Cd en début de développement n'est pas connue. Le but de ces travaux est d'évaluer la génotoxicité de ces 3 pesticides à des concentrations d'exposition réalistes d'un point de vue environnemental et du Cd après une exposition de 24h. Pour cela, la méthode RAPD-SHR a été utilisée. Des pontes d'escargot *Cantareus aspersus* ont été exposées durant 20 jours à différentes concentrations de pesticides proche de la EC₅₀ : 15 à 70 mg/L de RU[®]; 0,05 mg/L à 0,15 mg/L de Corail[®] et 1 à 2 g/L de cuivre (Cu) provenant de la BB. Les concentrations de Cd testées en exposition de 24 heures étaient de 5, 10 et 15 mg/L. Les 3 amorces utilisées pour les amplifications RAPD sur les ADN d'embryons exposés aux pesticides ont mis en évidence des effets génotoxiques du RU[®] (dose-dépendant) et du Corail[®] mais pas de la BB. Les 6 amorces utilisées lors des amplifications RAPD réalisées sur des embryons en cours de développement (Jour 1, 6, 7 et 12) exposés au Cd durant 24 heures n'ont pas révélé d'effets génotoxiques. Cette étude confirme que de la méthode RAPD-SHR est adaptée au criblage haut débit des effets sur l'ADN de contaminants variés chez l'embryon d'escargot exposé en continu.

Mots clés : *Cantareus aspersus*, formulation commerciale de pesticides, embryotoxicité, glyphosate, tébuconazole, Bouillie Bordelaise

III.2.2.1. Introduction

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) is a technique derived from the PCR which was originally used in taxonomic and phylogenetic approaches to detect polymorphism (De Wolf et al., 2004). Since one decade, this method is used in ecotoxicology for the detection of different types of DNA damage. RAPD permits to realize a rapid screening of the genotoxic potential of various contaminants after a PCR step with arbitrary short primers. The analysis is based on comparison of amplification profiles of exposed and control samples where each change detected along profiles (disappearance/appearance of fragment, changes in intensity of bands) can be directly related to various types of DNA damages and mutations in the genome studied (Atienzar and Jha, 2006 ; De Wolf et al., 2004).

RAPD was successfully used on many organisms as plants (Liu et al., 2009 ; Korpe and Aras, 2011 ; Gjorgieva et al., 2013), algae (Atienzar et al., 2000 ; Tuney et al., 2007), fishes (Mahrous et al., 2006 ; Mohanty et al., 2009 ; Galindo et al., 2010 ; Lerebours et al., 2013 ; Ben Salem et al., 2014). This technique has been used to detect signs of genotoxicity of various contaminants as heavy metals non essential: cadmium (Cd), bore, arsenic, mercury, nickel, aluminum (Atienzar et al., 2001 ; Cenkci et al., 2009 ; Al-Qurainy et al., 2010 ; Ahmad et al., 2012 ; Erturk et al., 2013) or essential: zinc, sodium, manganese, copper (Cu) (Enan, 2006 ; Tuney et al., 2007 ; Korpe and Aras, 2011 ; Orioux et al., 2011 ; Aydin et al., 2012 ; Gjorgieva et al., 2013). RAPD has also been used to demonstrate genotoxicity of various compounds: physical as the UV A and B (Atienzar et al., 2000), gamma rays (Dhakshanamoorthy et al., 2011), or still radioactivity of uranium and tritium (Hagger et al., 2005 ; Plaire et al., 2013) and emergent pollutant (nanoparticules: ZnO, CuO ; Lee et al., 2013). The genotoxicity of organic compounds like drugs (Rocco et al., 2010, 2011, 2012) or herbicides (Mohanty et al., 2009 ; Doganlar, 2012 ; Aksakal et al., 2013 ; Bozari and Aksakal, 2013) has also been largely studied. However, up to know, the potential of RAPD to detect DNA damages has been little used on embryos and on terrestrial animals. As far as we know, only 2 publications are available concerning the use of the RAPD method on embryos of aquatic invertebrates as urchins *Paracentrotus lividus* (Guida et al., 2010) or mussels *Mytilus edulis* (Hagger et al., 2005). Just one concerns terrestrial vertebrate: the kangaroo rats *Dipodomys merriami* (Theodorakis et al., 2001).

Recently, Baurand et al. (2013) have demonstrated that RAPD is adapted to show that Cd causes embryogenotoxic effect on the terrestrial snail embryos *Cantareus aspersus* (syn. *Helix aspersa*) at least after continuous exposure. They proposed a method to reduce subjectivity during profiles analysis by coupling the RAPD amplifications with a High Resolution electrophoresis System (HRS). This association helps to decrease problems and

time of migrations while increasing their quality and permits also a rapid automatic analysis of amplification profiles. RAPD-HRS has been used to demonstrate DNA damages of a continuous exposure to Cd for 20 days on *C. aspersus* embryos from 2 mg/L. Otherwise, Baurand et al. (2014a) have demonstrated the existence of early capacities of defense against the Cd by studying the expression of 3 isogenes coding metallothioneins (MTs) after 24 hours of exposure to Cd which mimics brief exposure e.g. to contaminated soil leachates. However, the genotoxic potential of such a short exposure to Cd has not been studied yet neither on embryos just after egg laying nor on older embryos.

Few data are available about embryotoxicity of pesticides on *C. aspersus*. EC₅₀ values based on hatching success are known for the Round Up flash[®] (RU[®] ; ~50 mg/L of glyphosate), the Corail[®] (~10 mg/L of tebuconazole) and the Bordeaux Mixture (BM ; ~1.5 g/L of Cu) (Druart et al., 2012). The embryogenotoxic potential of these commercial formulation used in vineyard treatment is still unknown. Until now, the couple RAPD-HRS has not been used to assess possible impact of herbicides or fungicides on DNA of snail embryos.

The aims of this work were:

1/ to determine if the couple RAPD-HRS is relevant to screen the genotoxic potential of pesticides (RU[®], Corail[®], BM) on the terrestrial snail embryos *C. aspersus*. In this purpose continuous exposure of eggs just after egg laying to relevant environmental concentrations of these chemicals was performed.

2/ to assess the influence of the exposure regime (24h vs continuous) on Cd genotoxicity. For that, the same scenario of exposure to Cd (24 h) as used by Baurand et al. (2014a) for MT analysis was applied here. Data obtained will be compare to the results obtained by Baurand et al. (2013) after continuous exposure to Cd.

3/ to determine if the genotoxic response to Cd was modulate by the age of embryos upon exposure. In this purpose, embryos were exposed at 2 keys steps of their development: at the start of embryogenesis (0 day) and organogenesis (6th day).

III.2.2.2. Materials and Methods

Chemicals

The concentrations of pesticides tested were chosen to surround the EC₅₀ values found by (Druart et al., 2010, 2012). All dilutions were prepared in demineralized water (pH 6.2), which was also used as a control solution. Solutions of RU[®] were prepared from commercial

formulation of Round Up Flash[®] (glyphosate 450 g/L, Monsanto). Nominal concentrations were 15, 30, 50 and 70 mg/L of glyphosate. The solutions of Corail[®] were prepared with commercial formulation Corail[®] (tebuconazole 250 g/L, Bayer Cropsciences). The tested nominal concentrations were 0.05, 0.10, 0.15 mg/L of tebuconazole. The solutions of BM were done from powder of Bordeaux Mixture RSR Disperss (20% of Cu, Cerexagri). Nominal exposure concentrations tested were 0.5, 1, 1.5, 2 g/L of Cu.

The solutions of Cd were prepared using solid CdCl₂ (99.99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; C- 2544). The nominal concentrations were 5, 10 and 15 mg/L as in Baurand et al. (2014b).

The concentrations of Cd and Cu were measured using ICP-AES (ICAP 6000 series model radial, Thermo scientific, France). The quality of the results was verified using a certified reference water (Hard Drink Water UK, ERM- CAO11a, LGC Promochem, Molsheim, France) Cd-certified at 4.94 µg/L (average recovery of 93%) and Cu-certified at 1970 µg/L (average recovery 97%). The actual verified concentrations were, respectively, 3.8, 8.7, and 13.1 mg/L for the Cd and 0.37, 0.76, 1.19, 1.49 g/L for the Cu.

Exposure device

Eggs were obtained from our laboratory rearing and were exposed using the liquid phase bioassay as previously described by Druart et al. (2010) and Baurand et al. (2013, 2014a). Five clutches per substance tested have been used. Each clutch was separated into groups of 10 eggs, which were placed in Petri dishes on four layers of paper (quantitative filter paper grade 1 ashless, Whatman) dampened with 0.8 mL of control or contaminated solution. For the 3 herbicides tested, eggs were exposed rapidly after the end of laying (maximum 24 h). Cadmium exposure was realized according to Baurand et al. (2014a). Eggs were exposed for 24 h to 3 Cd solutions (5, 10, 15 mg/L) at the beginning of their development or at the sixth day of embryogenesis.

After twenty days of development (to avoid omitting late hatchlings), the mean hatching success for each concentration was calculated. The results were considered valid if the hatching success of controls was at least of 70% (the average value observed in our laboratory rearing for controls). The dose-dependent curves and the EC₁₀ and EC₅₀ values were determined with the Hill's model using the macro Excel Regtox free version EV6.1. Each Petri dish with eggs was then kept at -80 °C until DNA extractions were performed.

DNA extraction

After exposure, DNA extractions were performed on two clutches among the 5 used for exposure to contaminants. The two chosen replicates presented a near response in terms of

hatching success. DNA has been extracted from eggs exposed at each concentration tested for the Corail[®] and the RU[®]. For the BM, DNA was extracted for three of the 4 concentrations used (1, 1.5, 2 g/L of Cu). For Cd, extractions were done for two (5 and 15 mg/L) of the 3 concentrations tested and a kinetic study was realized. For eggs exposed at day 0, sampling dates were 1 (end of exposure period), 6 and 12 days. For the samples exposed at 6 days of embryogenesis, the sampling dates were after 7 (end of exposure) and 12 days.

For pesticides, DNA extractions were realized on embryos after 20 days of exposure. To select primers and determine reference profiles for RAPD analysis, the genomic DNA from five other unexposed clutches has been extracted. Six day-old embryos were used to determine the reference profiles needed for RAPD analysis on the developing embryos. Embryos of 20 days (freshly hatched) were used for the reference profile used for RAPD on the samples exposed to pesticides.

All extractions on embryos aged of seven days maximum (or very small embryos which were exposed to the higher concentrations tested) were performed on embryos preliminary isolated from albumen of eggs using the QIAamp[®] DNA Micro (Qiagen, Hilden, Germany) whereas extractions on embryos aged of 12 days or more were realized with the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

For one day-old samples, 15 embryos were pooled whereas for the others samples (6, 7, 12 and 20 days) only three were sufficient. DNA samples were kept at -20 °C until the step of RAPD amplifications. The concentrations of the purified genomic DNA were measured at 260 nm, and the purity was estimated by measuring the 260/280 nm absorbance ratio with a Nanodrop Spectrophotometer (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A.). The 260/280 nm ratio for DNA samples from embryos aged of 6 days or less was between 1.0 and 1.4. The ratio for the DNA samples from embryos aged of 7 and 12 days was between 1.45 and 1.9. The quality of DNA samples was checked on 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

RAPD-PCR procedure

The RAPD reactions were performed using the PuRe Taq Ready-To-Go PCR beads kit (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA) according to Baurand et al. (2013). For each reaction, we added one bead of the kit (containing dNTPs, the BSA, and the polymerase AmpliTaqTM), 40 ng of DNA, 5 µL of random primer (5 pmol/µL), and ultrapure water for a final volume of 25 µL.

RAPD was performed, in a first time, on the five DNA extracts of i) 6 days-old non-exposed embryos and ii) 20 days-old embryos (freshly hatched). This procedure was realized

to create references profiles for analysis i) on developing embryos 24h-exposed to Cd and ii) on embryos pesticides-exposed during 20 days. Six primers were retained for RAPD realized developing embryos (for the kinetic study): Osama05 (GACCATCGTC), OPG05 (CTGAGACGGA), Essam08 (GCTCGAACTT), X19 (CCACCGCCAG), OPG17 (ACGACCGACA), Saad02 (GTGCTACGTC) whereas 3 primers were used (X19, OPG17 and Saad02) for amplifications on pesticides-exposed samples.

Selected primers permit obtaining amplification products with a reasonable number of distinct bands and a good reproducibility. For all the chemicals studied, each RAPD reaction was performed at least twice on each DNA extract. Amplification reactions were performed in a Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France) as follows: one initial denaturation step of 5 min at 95 °C followed by 45 cycles at 95 °C for 1 min (denaturation), 36 °C for 1 min (annealing), and 72 °C for 2 min (extension). The RAPD reaction products were stored at -20 °C.

Micro capillary electrophoresis and RAPD profile analysis

RAPD profiles have been analyzed via capillary electrophoresis using the QIAxcel system (<http://www.qiagen.com/products/qiaxcelsystem.aspx#Tabs=t1>). The parameters for migration were in the same used by Baurand et al. (2013) (OM500 method with a time sample injection of 30 s). The size of the amplified fragments was determined automatically by referring to the fragments obtained with the known size marker QX DNA Size Marker 100 bp-2.5 kbp. Next, the data obtained have been analyzed using the biocalculator software of the HRS. The standard parameters were kept for automatic analysis of profiles except for the positive threshold (a signal exceeding this value of maximal fluorescence is detected as a peak). We have chosen 6% for OPG17 primer, 5% for X19 and 4% for Saad02.

Estimation of genomic template stability

At each change observed in RAPD profiles (disappearance of bands and/or appearance of new bands) was given the arbitrary score of +1. The average number of changes was calculated for each chemicals with all primers used. The genomic template stability (GTS, %) was calculated for each primer as follows: $GTS (\%) = (1 - a/n) \times 100$, where a is the average number of changes in DNA profiles and n the number of bands selected in DNA control profiles.

III.2.2.3. Results

Effect of Cd and pesticides on hatching success

For Cd, the EC_{50-24h} based on hatching success for embryos exposed at 0 days was 5.05 mg/L (IC 95%: 4.41 – 5.69, Baurand et al., 2014a). For embryos exposed at 6 days, the EC_{50-24h} was 9.48 mg/L (IC 95%: 7.84 – 11.23).

EC_{50} values for RU[®], Corail[®] and BM were respectively 29.02 mg/L of glyphosate (IC95%: 21.3 – 41.3), 0.087 mg/L of tebuconazole (IC95%: 0.079 – 0.10) and 1.99 g/L of Cu (IC95%: 1.89 – 2.09).

RAPD-PCR on developing embryos exposed to Cd

The 6 primers used for the RAPD amplifications on developing embryos 24h-exposed to Cd generated a total of 24 specific and stable bands. The mean number of fragments amplified per primer was 4 (5 for X19 and OPG05 primer, 4 for OPG17 and Saad02, 3 for Essam08 and Osama05). No change between the profiles of controls and Cd-exposed samples (at 5 and 15 mg/L) was detected neither for embryos exposed at 0 day nor for those exposed at 6 days.

Figure III-15 represents results obtained for 2 of the 6 primers used: Saad02 primer for embryos 15 mg/L-exposed at 0 days (Figure III-15A and B) and Osama05 primer for 5mg/L-exposed embryos at 6 days (Figure III-15C and D).

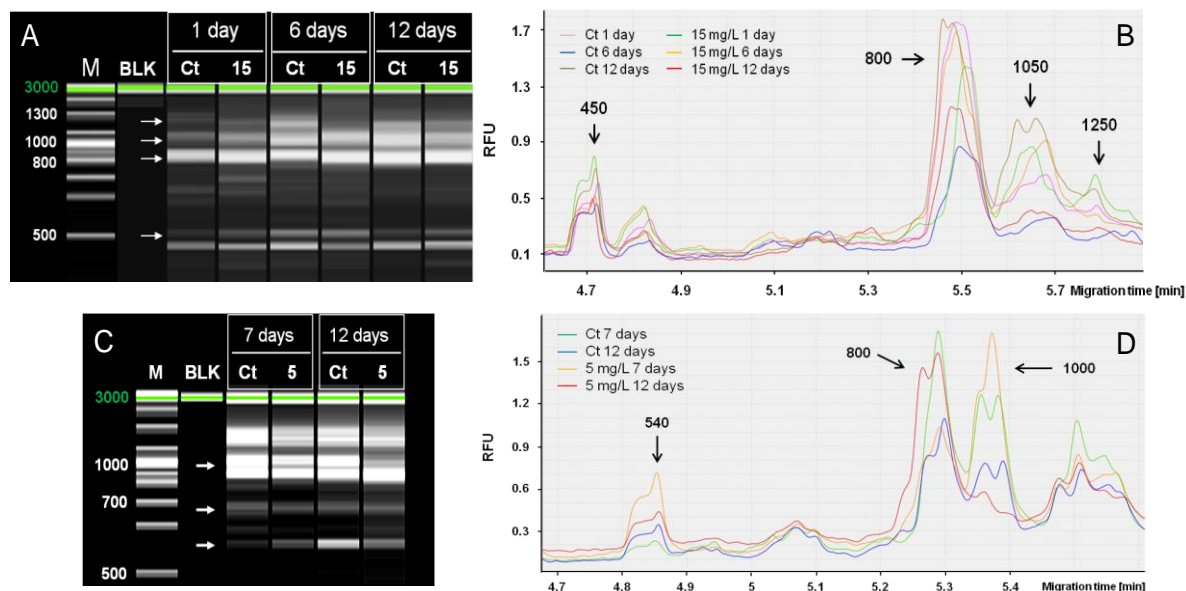


Figure III-15 : Migration pictures and electropherograms obtained for 2 of the 6 primers used in RAPD amplifications on Cd-exposed embryos.

Migration pictures (A) and electropherograms (B) obtained with Saad02 primer for Control or 15mg/L Cd-exposed embryos at 0 day and sampled after 1, 6 and 12 days and amplified. Migration pictures (C) and electropherograms (D) obtained with Osama 05 primer for Control or 5mg/L Cd-exposed embryos at 6 days and sampled at 7 and 12. M: size marker in bp; BLK: blank without DNA; Ct: control; 5, 15: 5 and 15mg/L Cd-exposed embryos. Arrows show fragments retained for each profile analysis.

RAPD-PCR on embryos exposed to pesticides

For each pesticides studied, the results presented below concern 1 clutch of the 2 studied showing the highest changes in profiles with one of the three primers used.

Round Up[®]

The samples exposed to the commercial formulation of glyphosate showed the largest number of changes in amplification profiles from the three pesticides used, with an increase of the modifications in profiles with the increase of concentration tested (Tableau III-4).

As shown on Figure III-16 presenting the clutch with the highest changes in RAPD profiles, RAPD-PCR with OPG17 primer show clear modifications from 30 mg/L of glyphosate with 2 disappearances of bands of 360 and 440 bp. At 50 and 70 mg/L of glyphosate, amplification profiles are completely modified and presented 6 or 5 new bands and 4 disappearances respectively.

Corail[®]

One of the 2 clutches exposed to Corail[®] presents modifications in RAPD profiles from the first concentration tested (0.05 mg/L). For example, amplifications realized with the Saad02 primer (Figure III-17) permit to detect appearance of one band (315 bp) in all Corail[®] exposed samples whereas 2 bands disappeared (1050 and 1250 bp) respectively in samples exposed at 0.05 and 0.10 mg/L of tebuconazole.

Bordeaux Mixture

No change was detected in all samples amplified with the 3 primers as shown in the Figure III-18 with RAPD profiles obtained after amplifications with the X19 primer.

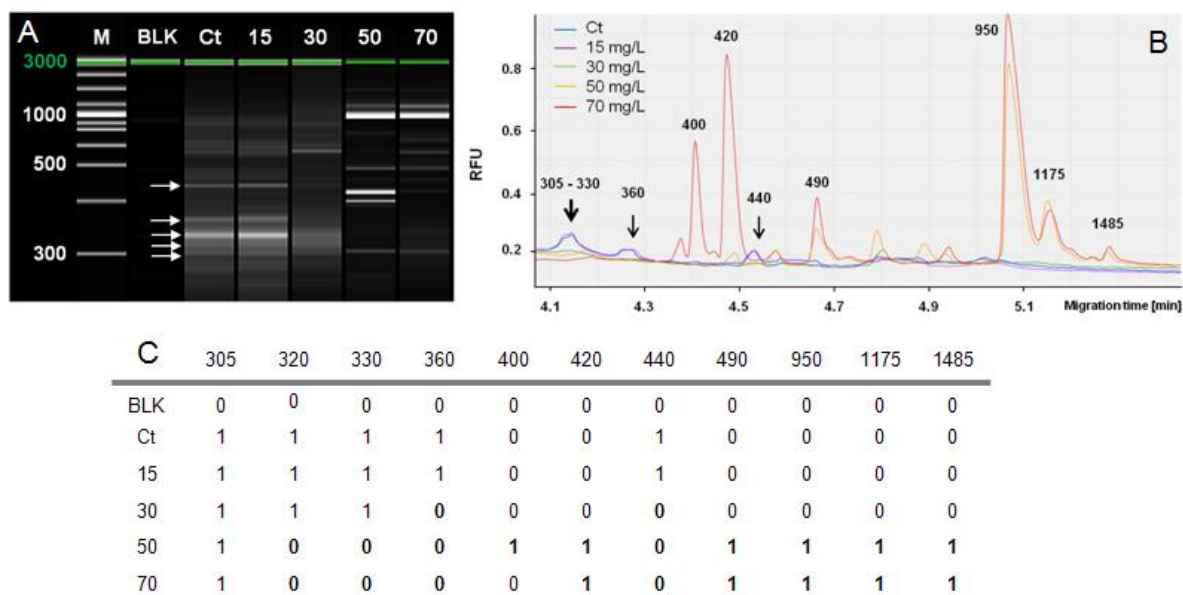


Figure III-16 : RAPD profiles obtained with OPG17 primer on Round Up[®]-exposed samples.

A: Gel image, B: electropherograms, C: binary matrix. M: size marker 100 bp to 2.5 kbp. BLK: blank without DNA; Ct: control; 15, 30, 50, 70: samples exposed at 15, 30, 50, 70 mg/L of active ingredient glyphosate. 300 to 1485: size of fragments in bp. Black and white arrows show the 5 fragments retained for profiles analysis.

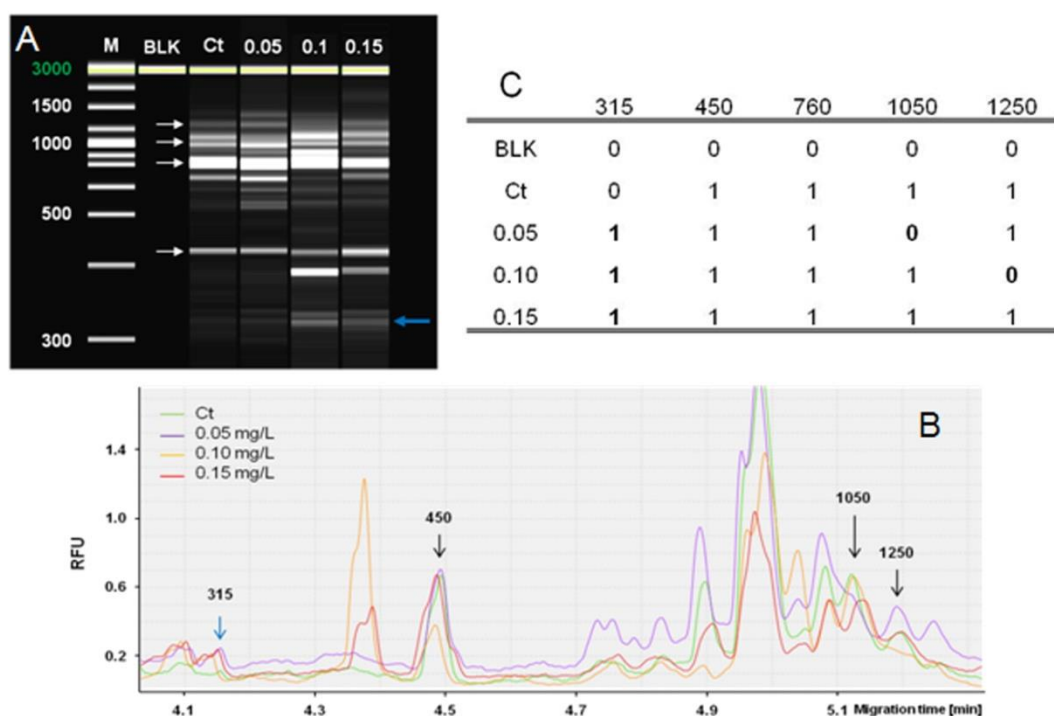


Figure III-17 : RAPD profiles migration obtained with Saad 02 primer on Corail[®]-exposed samples.

A: Gel image, B: electropherograms, C: binary matrix. M: size marker 100 bp to 2.5 kbp. BLK: blank without DNA; Ct: control; 0.05, 0.1, 0.15: samples exposed at 0.05, 0.10, 0.15 mg/L of active ingredient tebuconazole. 315 to 1250: size of fragments in bp. Black and white arrows show the 4 fragments retained for profiles analysis, the blue one show the new amplified fragment.

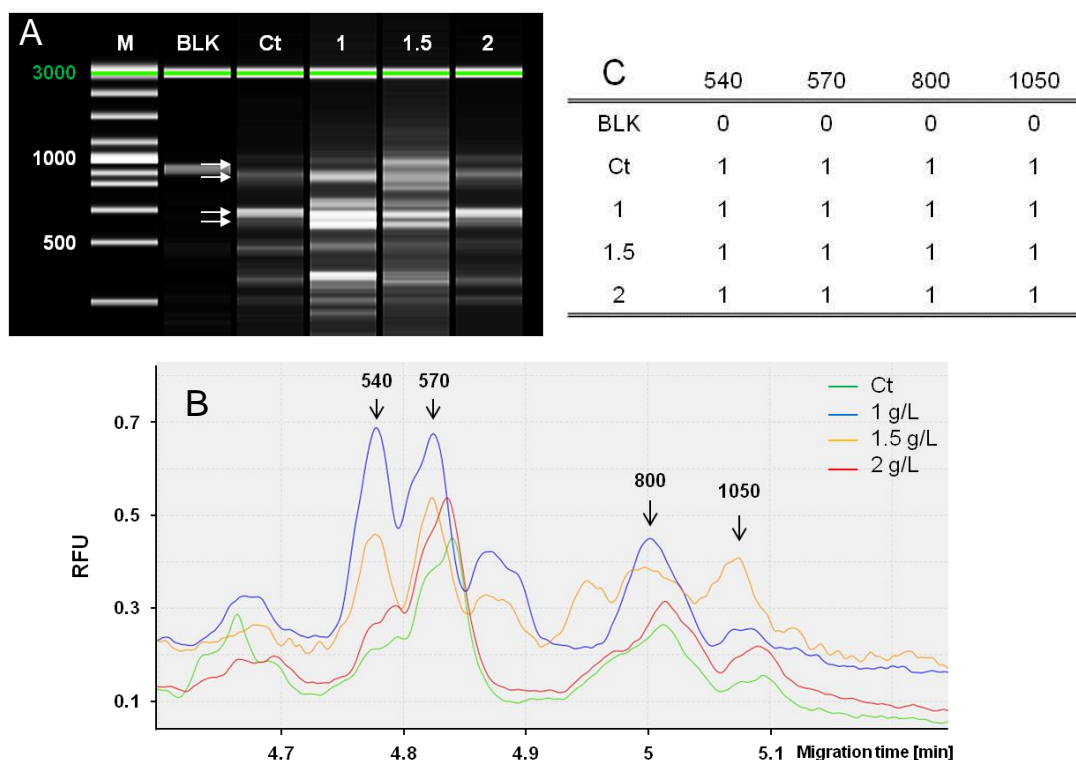


Figure III-18 : RAPD profiles migration obtained with X19 primer on Bordeaux Mixture-exposed samples.

A: Gel image, B: electropherograms, C: binary matrix. M: size marker 100 bp to 2.5 kbp. BLK: blank without DNA; Ct: control; 1, 1.5, 2: samples exposed at 1, 1.5, 2 mg/L of Copper. 540 to 1050: size of fragments in bp. Black and white arrows show the 4 fragments retained for profiles analysis.

Changes in profiles

Tableau III-4 : Summary of changes in RAPD profiles detected on pesticides-exposed embryos.

Number of bands in control samples and appearance (+) or disappearance (-) of bands for the 3 primers used in Round Up® (15 to 70 mg/L of glyphosate), Corail® (0.05 to 0.15 mg/L tebuconazole) and Bordeaux mixture (1 to 2 g/L of Copper) exposed samples.

			RU (mg/L of glyphosate)								Corail (mg/L of tebuconazole)						B. Mixture (g/L of Cu)						
		Clutch	Ctrl	15		30		50		70		0.05		0.10		0.15		1		1.5		2	
				+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Saad	a	4		0	0	0	0	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b			1	2	3	2	5	2	3	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPG	a	5		0	0	0	0	0	1	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b			0	0	0	2	7	4	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X19	a	4		0	0	0	0	2	1	5	3	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	b			0	0	1	1	6	3	6	3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Tableau III-4 resumes the changes detected in RAPD profiles of the samples exposed to pesticides (by comparisons to the control samples) for the 2 clutches investigated. For RU®-exposed samples, for one primer, the modifications detected after RAPD can be variable depending on the analyzed replicate. For example, Saad02 can detect the first modifications at

50 mg/L of glyphosate on one clutch (a) whereas in the other one, first changes in profiles were revealed at 15 mg/L (b). A huge number of changes in profiles were also detected from 50 mg/L with the 3 primers used. For amplifications with the primers OPG17 and X19, the alterations in profiles appear from 50 mg/L in one case (b) or from 30 mg/L (b) on the other clutch.

For the samples exposed to Corail[®], if the primer OPG17 has not permitted to show changes in profiles, RAPD with primer X19 gives globally the same results on the two replicates used. In each case, one band appears from 0.05 mg/L of tebuconazole and one disappears at 0.1 and 0.15 mg/L. The primer Saad02 permits to detect modifications in profiles in one clutch from 0.05 mg/L (b). Globally the number of changes in profiles of samples exposed to the Corail[®] formulation were lower than the changes detected in samples exposed to RU[®].

For the samples exposed to BM, no changes were revealed after RAPD with the 3 primers used.

Genetic templates stability

The value of Genetic templates stability (GTS, %) is a measure which reflects changes in RAPD profiles generated with the 3 primers used. The GTS total value was calculated for the 3 pesticides studied (Tableau III-5). For RU[®] exposure, the value of GTS decreases with the increased of RU[®] concentration (88.3% at 15 mg/L to 4.2% at 70 mg/L). On the contrary for samples exposed to Corail[®], the GTS remain relatively stable (87.5 to 83%) with the increase of concentrations tested whereas for BM exposure, GTS value is not modified (100%).

Tableau III-5 : Genomic template stability in Round Up®, Corail® and Bordeaux Mixture exposed samples.

Genomic template stability for each primer was calculated by the formula $GTS (\%) = (1 - a/n) \times 100$, where a is the average number of changes in DNA profiles and n the number of bands selected in control DNA profiles. a, b: clutch a and b for each pesticides studied.

		RU (mg/L)				Corail (mg/L)			BM (g/L)		
clutch		15	30	50	70	0.05	0.1	0.15	1	1.5	2
Saad	a	100	100	25	0	100	100	100	100	100	100
	b	25	0	0	25	75	50	50	100	100	100
	mean	62.5	50	12.5	12.5	87.5	75	75	100	100	100
OPG	a	100	100	80	0	100	100	100	100	100	100
	b	100	60	0	0	100	100	100	100	100	100
	mean	100	80	40	0	100	100	100	100	100	100
X19	a	100	100	25	0	75	75	75	100	100	100
	b	100	50	0	0	75	100	75	100	100	100
	mean	100	75	12.5	0	75	87.5	75	100	100	100
mean	Total	88.3	68.3	21.6	4.2	87.5	87.5	83.3	100	100	100

III.2.2.4. Discussion

Cd short exposure effects on embryos

In order to realize a larger screening of the genome of embryos and thus to improve the chances to detect modifications in RAPD patterns, 6 primers were used in this study instead of the 2 used by Baurand et al. (2013). A kinetic study of apparition of DNA damages and/or mutations was realized during the embryonic development of *C. aspersus*. Surprisingly, no change was detected at the sampling dates investigated from the end of exposure periods (1 day or 7 days) until 12 days of development. This was not expected as Baurand et al. (2013) have shown signs of genotoxicity from 2 mg/L in eggs exposed during 20 days. Several parameters may be responsible of these contrasted results obtained for the two types of scenarios of Cd exposure (24 hours here and continuous exposure in Baurand et al., 2013).

First, in the present study, the later point which has been investigated was 12 days. Thus, the duration of exposure (8 days less here) maybe involved in the case of Cd genotoxic effects become visible only at the end of the development. Agnello et al. (2006) have hypothesized, when studying Cd effect on *Paracentrotus lividus* embryos, the occurrence of toxic effect would depend both on Cd concentration and of the duration of exposure. According to these authors, we can assume that the metallic stress generated by a 24 hours of Cd exposure (from 5 to 15 mg/L) is not the same that the one of a 20 days continuous exposure (at 2, 4 and 6 mg/L) because these 2 factors change (exposure duration and concentration). A differential

diffusion of Cd^{2+} ions between the 2 scenarios of exposure possibly occurred as evoked by Baurand et al. (2014b).

Secondly, interventions of DNA reparation systems or of metal-specific systems of defense like metallothioneins (MTs), which are known to have a role in Cd detoxification in developing snail embryos (Baurand et al., 2014a) can be suspected. It has been demonstrated that early life stages of *C. aspersus* are able to respond to a stress induced by the Cd by synthesizing a specific MT from their first day of development. Baurand et al. (2014, *in prep*) has also shown that embryos Cd exposed at the beginning of their organogenesis for 24 hours have higher capacities of *CdMT* gene expression at 12 days than embryos exposed with the same scenario at the start of the embryonic development. Our study show that the difference of sensivity of 0 and 6 days-exposed embryos observed on the EC_{50} -hatchability is not related to a difference in genotoxic effects.

Overall present data demonstrate that the assessment of genotoxicity must be carefully interpreted as many factors can influence the result (e.g. regime of exposure, age and individual sensitivity to chemicals, capacities of detoxification process throughout embryogenesis...). RAPD-HRS system appears as an adapted method to investigate these parameters.

Pesticides exposure effects on embryos

The toxicity values (EC_{50}), based on the hatching success, found in this study for the 3 pesticides investigated are in the same range of sensitivity than found by Druart et al. (2012, 2010) and confirm the good repeatability of the liquid phase bioassay. They have reported EC_{50} of 0.095 mg/L of tebuconazole for the Corail[®], 43 and 55 mg/L of glyphosate for the RU[®] and 1.5 g/L of Cu. All concentrations tested in our study were inferior to the dose preconized for field applications on vineyards (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr>). These recommended values are of 700 mg/L of tebuconazole, 5140 mg/L of glyphosate, and 7.64 g/L of Cu respectively for the the Corail[®], RU[®] and the BM (Druart et al., 2012).

Round up[®]

The RU[®] is an herbicide containing glyphosate as active ingredient and also adjuvants like the surfactant polyoxyethylene amine (POEA). The Saad02 primer, in our experimentation, has permitted to highlight genotoxic effects from the first concentration tested (15 mg/L of glyphosate) whereas no significant effect on hatchability was found at this concentration. Present study is the first one reporting genotoxic effects of commercial formulation of glyphosate (Round Up Flash[®]) on embryos of a terrestrial species on the basis

of RAPD-PCR detection. Among the 3 pesticides studied, the RU[®] was the one who showed the highest number of alterations in profiles of exposed samples. The screening of effect with the 3 primers used revealed a huge number of modifications (disappearances and appearances of bands) that confirm strong changes at genomic level. The disappearance of a band in a RAPD profile can be related to different events such as DNA damage (single and/or double-strand breaks, DNA adducts, oxidized bases, DNA–protein cross-links), point mutations and/or complex chromosomal rearrangements (Atienzar et al., 1999, 2000). The new amplification products may reveal changes in some oligonucleotide priming sites due to mutations, large deletions (bringing to pre-existing annealing site closer), and/or homologous recombination (juxtaposition of two sequences that match the sequences of primer) (Atienzar et al., 1999).

There is a lack of information concerning the genotoxic potential of RU[®] on embryos. Using the micronucleus test and comet assays, Poletta et al. (2009) showed the genotoxicity of RU[®] in erythrocytes of caiman embryos (*Caiman latirostris*) exposed to 500 µg of RU/eggs. In our study a strong genotoxic effect was revealed for exposure to RU[®] as shown the changes in GTS total (88.3% at 15 mg/L to 4.2% to 70 mg/L). The EC₅₀ value based on hatching success of 29 mg/L was associated to a decreased in GTS values near to 30% (100% for control to 68.3% for 30 mg/L exposed embryos).

Corail[®]

Corail[®] is a fungicide of the triazol family, used in preventive and curative treatment phytopathogenic fungi like the powdery mildew, the Brenner and the black rot of vine. Its active ingredient is tebuconazole (250 g/L). There is no data available about genotoxicity of Corail[®]. However, toxic effect has been reported in *Gammarus pulex* with an LD₅₀ of 1.6 mg/L of a.i. (Adam et al., 2009) or on zebrafish *Danio rerio* with a LD₅₀ of 20 mg/L of a.i. (Sancho et al., 2010). Our study brings evidences concerning the genotoxic potential of the commercial formulations of Corail[®] which appears at very low concentration (0.05 mg/L) compared to the recommended dose (700 mg/L of tebuconazole). But no concentration effect response was found as shown by the decrease of GTS values about 13% for the 3 tested concentrations. This pesticide was the most toxic of the 3 tested (based on EC₅₀ values) but effects are poorly related to genotoxicity in the present study.

Bordeaux Mixture

The BM is a mixture of sulfate of copper (CuSO₄) and slaked lime (Ca (OH)₂) also used as a fungicide. It is sprayed in vineyards, but also in fruit - farms and gardens to prevent infestations of downy mildew, powdery mildew and other fungi. Genotoxic effects of Cu or

Cu-based compounds have been demonstrated in different organisms. For example, Cu sulfate has been reported as genotoxic after sister chromatid exchange (SCE) tests in lymphocytes of rabbits gavaged by 7.5 mg Cu/kg body weight daily for 6 days (Georgieva et al., 2013). Comet assays as permitted to detect genotoxic effect of Cu in whole blood of mice gavaged for 6 days with 8.5 mg/kg copper (Pra et al., 2008) whereas genotoxic potential of Cu has been demonstrated in larvae of chironomidae (*Chironomus kiiensis*) after a 24 hours exposure (0.2 to 20 mg/L) by Al-Shami et al. (2012).

In our study, the BM doesn't cause genotoxic effect on snails embryos (on the basis of the results obtained with the 3 primers used) whereas this fungicide shows an inhibitory effect on hatchability of *C. aspersus* snails from 2 g/L of Cu. Thus there is not links between toxicity based on hatching success and genotoxic effect in our study. Cu is an essential metal which can be regulated by organisms partly due to the presence of the CuMT that can play a role in homeostasis of Cu. Transcription of the gene coding this MT has been demonstrated in *C. aspersus* embryos (Baurand et al., 2014b). The *CuMT* gene was known to be up-regulated during Cu stress in adults (Höckner et al., 2011). Thus the probable presence of this protein in embryos and its induction possibly explained the low genotoxic potential found for this contaminant in our experimental conditions.

III.2.2.5. Conclusion

Our work demonstrate that the RAPD-HRS is adapted for a rapid and efficient screening of genotoxic effect of various contaminants at relevant environmental concentration. This method appears adapted to genotoxicity detection even in very young embryos (from one day) of the terrestrial snail *C. aspersus*.

On the basis of variation of the GTS % values we have evidenced i) importance of the regime of exposure to Cd (duration of exposure, period of embryogenesis, range of exposure concentrations) during genotoxic potential study of a chemical, and ii) individual sensitivity pesticide-exposed embryos. The most toxic pesticide (Corail) for snail embryos is not the most genotoxic and the toxicity of some toxicants can be i) related to genotoxicity (RU[®]) or ii) independent of genotoxic effect (for Cu) or iii) in part related to genotoxic effect (Corail[®]).

III.2.2.6. Acknowledgements

The authors warmly Anne-Claude Gabiot-Goydadin, and Dominique Rieffel for technical assistance. We are also grateful to the Regional Council of Franche-Comté and the University of Franche-Comté, who funded this work.

III.2.2.7. References

- Adam, O., Badot, P.-M., Degiorgi, F., Crini, G., 2009. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 441–449.
- Agnello, M., Filosto, S., Scudiero, R., Rinaldi, A.M., Roccheri, M.C., 2006. Cadmium accumulation induces apoptosis in *P. Lividus* embryos. *Caryologia* 59, 403–408.
- Ahmad, M.A., Gaur, R., Gupta, M., 2012. Comparative biochemical and RAPD analysis in two varieties of rice (*Oryza sativa*) under arsenic stress by using various biomarkers. *J. Hazard. Mater.* 217, 141–148.
- Aksakal, O., Aygun Erturk, F., Sunar, S., Bozari, S., Agar, G., 2013. Assessment of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis. *Ind. Crops Prod.* 42, 552–557.
- Al-Qurainy, F., Alameri, A.A., Khan, S., 2010. RAPD profile for the assessment of genotoxicity on a medicinal plant; *Eruca sativa*. *J. Med. Plants Res.* 4, 579–586.
- Al-Shami, S.A., Rawi, C.S.M., Ahmad, A.H., Nor, S.A.M., 2012. Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short-term exposure. *Toxicol. Ind. Health* 28, 734–739.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutat. Res.* 613, 76–102.
- Atienzar, F.A., Cheung, V.V., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.* 59, 241–250.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2275–2282.
- Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquat. Toxicol.* 50, 1–12.
- Aydin, S.S., Gokce, E., Buyuk, I., Aras, S., 2012. Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 746, 49–55.
- Baurand, P.-E., de Vauflery, A., Scheifler, R., Capelli, N., 2013. Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analysis and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9505–9513.
- Baurand, P.-E., Pedrini-Martha, V., De Vauflery, A., Niederwanger, M., Capelli, N., Scheifler, R., Dallinger, R., 2014a. Differential expression of metallothionein isoforms in snail embryos reflects early life stage adaptation to metal stress. Submitted
- Baurand, P.-E., Capelli, N., Scheifler, R., De Vauflery, A., 2014b. An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization. Submitted
- Baurand, P.-E., Dallinger, R., Niederwanger, M., Capelli, N., Pedrini-Martha, V., De Vauflery, A., 2014. Differential sensitivity of snail's embryos to Cd: relation with age and MT genes expression. *In prep*
- Ben Salem, Z., Capelli, N., Grisey, E., Baurand, P.-E., Ayadi, H., Aleya, L., 2014. First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 90–96.
- Bozari, S., Aksakal, O., 2013. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect genotoxic effect of trifluralin on maize (*Zea mays*). *Drug Chem. Toxicol.* 36, 163–169.
- Cenkci, S., Yıldız, M., Cigerci, A., Konuk, M., Bozdog, A., 2009. Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere* 76, 900–906.
- De Wolf, H., Blust, R., Backeljau, T., 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutat. Res.* 566, 249–262.

- Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R., Chidambaram, A.L.A., 2011. Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker. C. R. Biol. 334, 24–30.
- Doganlar, Z.B., 2012. Quizalofop-p-ethyl-induced phytotoxicity and genotoxicity in *Lemna minor* and *Lemna gibba*. J. Environ. Sci. Health Part A 47, 1631–1643.
- Druart, C., Scheifler, R., de Vaufléury, A., 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. J. Hazard. Mater. 184, 26–33.
- Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., de Vaufléury, A., 2012. Landsnail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. Appl. Soil Ecol. 53, 56–64.
- Enan, M.R., 2006. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. Biotechnol. Appl. Biochem. 43, 147–154.
- Erturk, F.A., Ay, H., Nardemir, G., Agar, G., 2013. Molecular determination of genotoxic effects of cobalt and nickel on maize (*Zea mays* L.) by RAPD and protein analyses. Toxicol. Ind. Health 29, 662–671.
- Galindo, B., Troilo, G., Cólus, I., Martinez, C., Sofia, S., 2010. Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Water Air Soil Pollut. 212, 419–428.
- Georgieva, S., Popov, B., Petrov, V., 2013. Genotoxic effects of copper sulfate in rabbits. Arch. Biol. Sci. 65, 963–967.
- Gjorgieva, D., Kadifkova Panovska, T., Ruskovska, T., Bačeva, K., Stafilov, T., 2013. Influence of heavy metal stress on antioxidant status and DNA damage in *Urtica dioica*. BioMed. Res. Int. 2013, 1–6.
- Guida, M., Guida, M., De Felice, B., Santafede, D., D'Alessandro, R., Di Spiezio Sardo, A., Scognamiglio, M., Ferrara, C., Bifulco, G., Nappi, C., 2010. Assessment of DNA damage by RAPD in *Paracentrotus lividus* embryos exposed to amniotic fluid from residents living close to waste landfill sites. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 1–8.
- Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol. 74, 205–217.
- Korpe, D.A., Aras, S., 2011. Evaluation of copper-induced stress on eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings at the molecular and population levels by use of various biomarkers. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 719, 29–34.
- Lee, S., Chung, H., Kim, S., Lee, I., 2013. The genotoxic effect of ZnO and CuO nanoparticles on early growth of buckwheat, *Fagopyrum esculentum*. Water Air Soil Pollut. 224, 1–11.
- Lerebours, A., Cambier, S., Hislop, L., Adam-Guillermin, C., Bourdineaud, J.-P., 2013. Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 755, 55–60.
- Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Xie, L.J., Han, Y.P., 2009. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. J. Hazard. Mater. 161, 878–883.
- Mahrous, K.F., Khalil, W.K.B., Mahmoud, M.A., 2006. Assessment of toxicity and clastogenicity of sterigmatocystin in egyptian nile tilapia. Afr. J. Biotechnol. 5, 1180–1189.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Garnayak, S.K., Dutta, S.K., 2009. PCR based detection of furadan genotoxicity effects in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. Vet. Res. Commun. 33, 771–780.
- Orieux, N., Cambier, S., Gonzalez, P., Morin, B., Adam, C., Garnier-Laplace, J., Bourdineaud, J.-P., 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 974–983.
- Plaire, D., Bourdineaud, J.-P., Alonzo, A., Camilleri, V., Garcia-Sanchez, L., Adam-Guillermin, C., Alonzo, F., 2013. Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 158, 231–243.
- Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D., 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 672, 95–102.

- Prá, D., Franke, S.I.R., Giulian, R., Yoneama, M.L., Dias, J.F., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P., 2008. Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *BioMetals* 21, 289–297.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V., 2010. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1530–1536.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Zito, G., Archimandritis, A., Peluso, C., Stingo, V., 2012. Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants. *Environ. Toxicol.* 27, 18–25.
- Rocco, L., Izzo, A., Zito, G., Peluso, C., 2011. Genotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to two pharmacological products from an impacted Italian river. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 1, 2161–0525.
- Sancho, E., Villarroel, M.J., Fernández, C., Andreu, E., Ferrando, M.D., 2010. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 370–376.
- Theodorakis, C.W., Bickham, J.W., Lamb, T., Medica, P.A., Lyne, T.B., 2001. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada Test Site, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 317–326.
- Tuney, I., Unal, D., Sukatar, A., 2007. Effects of external polyamines on DNA under the highest copper toxicity in *Ulva lactuca* L. and genotoxicity detection by RAPD-PCR assay. *Fresenius Environ. Bull.* 16, 1667–1670.

III.2.3. Résumé du chapitre 2

- La technique RAPD couplée à un système d'électrophorèse haute résolution permet une détection efficace des effets génotoxiques de contaminants variés chez l'embryon d'escargots exposés en continu.
- Cette méthode permet de détecter des effets génotoxiques du Cd variable selon le régime d'exposition (effets dès 2 mg/L en exposition continue, aucun effet en exposition de 24 h). Elle a également montré des effets au niveau génomique après exposition à des concentrations de Round Up Flash® et de Corail® bien inférieures aux doses recommandées pour les traitements de la vigne.

III.3. CHAPITRE 3 Les systèmes de détoxification métal-spécifiques chez l'embryon d'escargot

Des effets génotoxiques du cadmium ont pu être mis en évidence par RAPD lors d'expositions continues des œufs alors qu'en exposition courte (24 h) aucun effet n'a été observé. Si la toxicité du Cd peut être diminuée chez les escargots adultes par la mise en place des systèmes de détoxification par les métallothionéines (MTs), aucune donnée n'était disponible sur ces protéines chez les embryons. Aussi nous avons recherché la présence des gènes codants les 3 isoformes de MTs et étudié leur expression et leur spécificité de réponse dans divers contextes d'exposition (cf Tableau II.6-1) :

- chez des embryons non exposés au cours du développement embryonnaire pour connaître les niveaux d'expression basale des gènes des *MTs*.
- après exposition de 24 h au Cd à divers stades de développement (0 ou 6 jours) afin de déterminer l'influence de l'âge dans les réponses des embryons au Cd.
- après exposition continue à des contaminants métalliques pour déterminer l'influence des modalités d'expositions sur les réponses des embryons.

Ce chapitre présente les travaux effectués sur les MTs chez l'embryon d'*Helix aspersa* sous forme de trois projets de publications : un article scientifique et 2 articles courts rédigés en anglais.

III.3.1. Differential expression of metallothionein isoforms in snail embryos reflects early life stage adaptation to metal stress

Cette première publication est en cours de révision dans la revue PLOS ONE. Elle porte sur la détection des 3 isogènes codant les 3 isoformes des MTs (déjà connues chez l'adulte d'*H. aspersa*) et leur expression chez l'embryon suite à une exposition au Cd. Les auteurs sont Pierre-Emmanuel Baurand, Veronika Pedrini-Martha, Michael Niederwanger, Nicolas Capelli, Renaud Scheifler, Annette de Vaufleury et Reinhard Dallinger.

Résumé

Le but de cette étude est d'analyser l'expression des gènes des 3 isoformes de métallothionéine (*CdMT*, *CuMT*, et *CdCuMT*) déjà connus chez les adultes, chez les stades embryonnaire de l'escargot *Helix aspersa*. Pour cela, la détection des 3 isogènes a été réalisée par PCR et la quantification de leurs niveaux d'expressions respectifs a été effectuée par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR). Des œufs ont été exposés pendant 24 h rapidement après la fin de la ponte à des concentrations croissantes de cadmium (5, 10 ou 15 mg/L). La détection des 3 gènes a été réalisée par PCR chez des embryons de 1, 6 et 12 jours exposés ou non au Cd. La transcription des 3 gènes des isoformes des MTs au cours du développement embryonnaire a été suivie par qRT-PCR chez des embryons de 6 et 12 jours. Les résultats montrent que les gènes *CdMT* et *CdCuMT* sont exprimés chez les embryons dès le premier jour de développement alors que le gène *CuMT* ne l'est pas. La transcription des 3 gènes de MT chez les embryons témoins augmente avec la durée de développement. Ceci suggère que les capacités de régulation et de détoxification des métaux augmentent graduellement au cours de l'embryogenèse de l'escargot. De plus, chez les témoins, le gène *CdCuMT* présente le taux d'expression significativement le plus élevé comparé à ceux des 2 autres gènes étudiés. Ce résultat laisse supposer chez l'embryon une fonction plus importante du gène *CdCuMT* dans la physiologie des métaux en comparaison au rôle marginal qui lui avait été assigné chez les individus adultes. Les fonctions de ce gène apparaissent comme non reliées à la détoxification du Cd. Les embryons exposés au Cd sont capables de surexprimer le gène *CdMT* de manière concentration-dépendante, alors que l'expression des gènes *CuMT* et *CdCuMT* n'est pas affectée dans ces conditions d'exposition. Cette étude a permis de caractériser l'expression des gènes de 3 isoformes de MT au cours du développement des embryons de l'escargot *H. aspersa* et de démontrer la capacité très précoce de ces derniers à répondre au Cd par la surexpression spécifique du gène *CdMT*.

Mots clés : cadmium, stade embryonnaire, détoxification, mollusque gastéropode

III.3.1.1. Introduction

Metallothioneins (MTs) constitute a superfamily of proteins that specifically bind to closed-shell metal ions (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{+}) via the sulfur atoms of their rich cysteine residues (Kägi 1993 ; Blindauer and Leszczyszyn, 2010). They are involved in metal-related tasks including metal ion detoxification and homeostasis (Kägi 1991 ; Dallinger et al. 1997 ; Egli et al. 2006 ; Klaassen et al. 2009), radical scavenging (Baird et al., 2006) and stress response (Fu and Miao, 2006). Their specific physiological role may vary among animal species, the tissues in which they are expressed and the MT family to which they belong (Dallinger, 1996). Terrestrial gastropods, for example, possess three MT isoforms, two of them with metal-selective features, performing metal-specific tasks (Dallinger et al., 1997). Notably, one of these isoforms is cadmium (Cd)-selective and devoted to the detoxification of this harmful metal in digestive tissues (Chabicovsky et al., 2003); the other is copper (Cu)-selective and involved in the regulation of Cu in connection with haemocyanin synthesis (Dallinger et al., 2005). A third, non-specific MT isoform is expressed constitutively at only low basal levels and is hardly detected, if at all, in adult snails (Hispard et al., 2008 ; Höckner et al., 2011).

Terrestrial gastropods are particularly exposed to toxic metals in their habitat: not only do they move slowly and are in close contact with the soil substrate on which they thrive, but they also lay their eggs in the soil. Depending on meteorological and microclimatic conditions, the availability of trace elements to snails in the surrounding soil may fluctuate and change rapidly (Egg et al., 2009). Perhaps as an adaptation to these alternating conditions, terrestrial gastropods are able to accumulate and detoxify certain toxic metals in their digestive tissues (Dallinger and Wieser 1984 ; Scheifler et al., 2002 ; Chabicovsky et al., 2003). The non-essential Cd, in particular, is inactivated when bound to the expressed Cd-specific MT isoform (Dallinger et al., 1989 ; Dallinger et al., 1993). The gene of this isoform is selectively up-regulated upon exposure to this metal, whereas the two other MT isoform genes do not respond to Cd or Cu exposure (Palacios et al., 2011 ; Höckner et al., 2011). This Cd-specific response may confer to terrestrial helicids their relatively high tolerance for elevated environmental levels of this harmful metal.

The physiological and toxicological significance of the transcriptional regulation of the three MT isoform genes has recently been studied in adult garden snails, *Cantareus aspersus*, during a long-term metal exposure of 29 days (Höckner et al., 2011). It appears that the exclusive up-regulation of the *CdMT* isoform gene is in accordance with the relatively high Cd tolerance of this species, whereas the non-responsive transcription pattern of the two other MT genes indicates their comparatively low significance in the metabolic handling of Cd.

No data are available, however, on the presence and expression of the three MT isoforms in Early Life Stage (ELS) individuals (eggs, embryos) of *C. aspersus*. This may be important considering that in invertebrates, ELS may differ from adults in their sensitivity toward metal exposure (Enserink et al., 1990 ; Salice and Roesijadi, 2002); the differential MT expression can play a crucial role in this concern (Geffard et al., 2002). Recent studies on *C. aspersus* embryos (Druart et al., 2010, 2012) reported a low sensitivity (based on hatching rate) of this species toward Cd with an EC₅₀ of approximately 3.5 mg/L during continuous exposure over 20 days. Furthermore, very high Cd concentrations (up to 8 mg/L) are required to completely inhibit the hatching process. Baurand et al. (2013) have shown genotoxic effects of Cd on *C. aspersus* embryos at exposure concentrations of 2 mg/L and a fragmentation of genomic DNA after 20 days of exposure to 6 mg/L Cd. The same Cd concentration disrupted the development of embryos by causing a decrease in cardiac rhythm and growth, and hatching delays (Baurand et al., 2014). Thus, overall, ELS individuals of *C. aspersus* exhibit a relatively high tolerance towards Cd exposure. However, little is known about the underlying mechanisms, particularly with respect to the expression of the three MT isoform genes and their potential role during Cd exposure.

Therefore, the aim of this study was to analyze the transcription of the three MT isoform genes in ELS of *C. aspersus* and to quantify their potential gene up-regulation due to Cd exposure.

III.3.1.2. Materials and Methods

Exposure solutions

Cd solutions were prepared by dissolving solid CdCl₂ (99.99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; C-2544) in demineralized water (pH 6.2), which was also used as a control solution. The concentrations of Cd in solutions were measured by means of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) (ICAP 6000 series model radial, Thermo scientific, France). The quality of the results was verified using reference water (Hard Drink Water, ERM- CAO11a, Molsheim, France) that was Cd-certified at 4.94 µg/L (+/- 0.23 µg/L, average recovery of 93%). The nominal concentrations of exposure solutions were 5, 10 and 15 mg Cd/L, whilst actual concentrations were 3.8, 8.7, and 13.1 mg Cd/L, respectively.

Exposure conditions and Cd treatment

Eggs were obtained from standardized laboratory rearing at the laboratory of Chrono-Environnement (University of Franche-Comté, Besançon, France) and were exposed using the liquid phase bioassay as previously described (Druart et al., 2010, 2012). Briefly, clutches

were separated into groups of 10 eggs each and placed into Petri dishes on four layers of paper (Quantitative filter paper grade 1 ashless, Whatman) dampened with 0.8 mL of demineralized water or one of the three Cd solutions, respectively. Different eggs from each clutch used were exposed to one of the four treatments (one control and the 3 Cd concentrations). Eggs of a same clutch were tested exclusively in one of the three exposure regimes. Three exposure regimes were carried out (Figure III-19).

In the exposure regime I, three separate clutches were used for the determination of Cd concentrations in the entire egg (eggshells, albumen and embryos). The exposure started just after the end of eggs laying (indicated by “day 0”). At day 0, (just before the beginning of exposure), 1 day (end of 24 hour exposure), 6 days and 12 days, five eggs (approximately 30 mg dry mass) were pooled from each of the exposure treatments (Figure III-19A).

The exposure regime II was carried out in order to detect the transcription of the MT isoform genes during the development by applying Polymerase Chain Reaction (PCR) and quantitative Real Time PCR (qRT-PCR). For PCR of the three MT isoform gene transcripts, snail eggs were sampled at days 1 (first stage of embryonic development), 6 (start of organogenesis) and 12 (end of organogenesis) (Figure III-19A). For the 1 day-old embryos, which were very small (diameter < 500 μ M), 15 embryos were pooled for each Cd concentration applied (4 replicates of 15 embryos each). 3 embryos were pooled to one sample for 6 and 12 day old individuals (Figure III-19B). Four clutches were used for qRT-PCR. In this case, three sampling dates were chosen: 6, 7 and 12 days (Figure III-19A). For the 7 day samples, only control samples were used. At each sampling date, 3 embryos (controls or Cd-exposed) were extracted from albumen (Figure III-19B) and processed for RNA isolation as described below.

In the exposure regime III, three clutches were used for determination of Cd toxicity parameters (Figure III-19A). Each clutch was separated into four groups corresponding to one of the four exposure conditions: control (demineralized water) and three Cd treatments (see above). After 24 hours, eggs were placed on paper with demineralized water for the remainder of the developmental period. Twenty days after the beginning of the experiment, the mean hatching success for each concentration was calculated (Figure III-19A). The results were considered valid if the hatching success of controls was at least 70% of the average value normally observed for controls under laboratory rearing conditions.

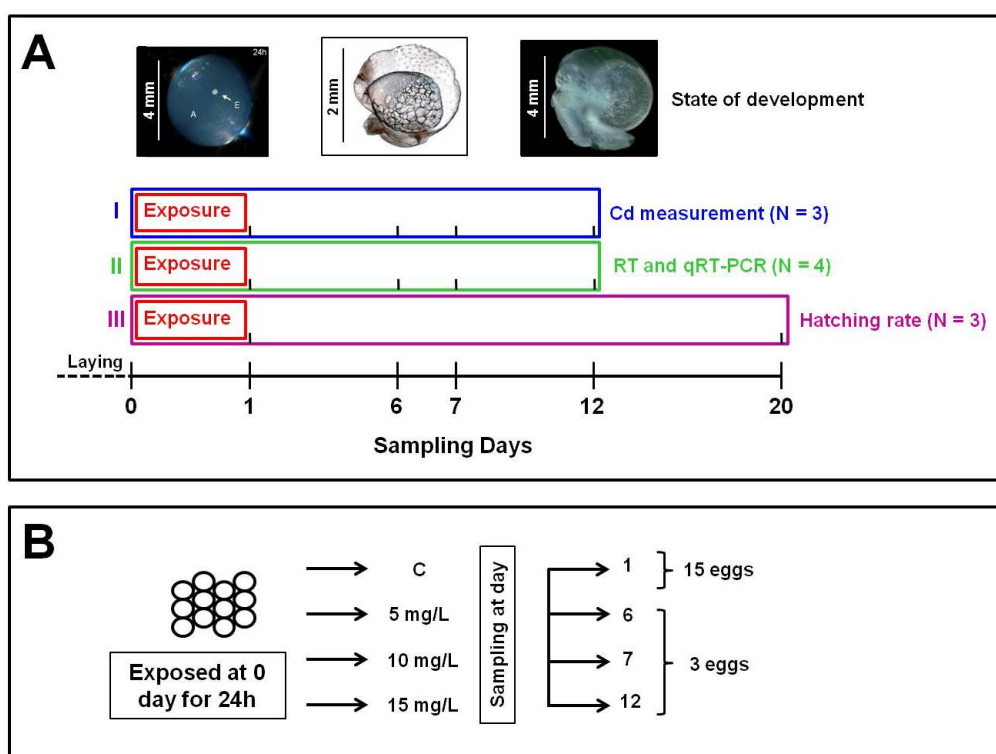


Figure III-19 : Scheme of exposure and sampling conditions during embryonic development of control and Cd-exposed eggs of *Cantareus aspersus* applied to the present study.

(A) Illustration of developmental stages of snail embryos (above), followed by details of exposure regimes and sampling dates applied for (I) the assessment of Cd concentrations in snail embryos, (II) RT and qRT-PCR detection of embryonic MT isoform genes, and (III) evaluation of successful hatching rates during development along the time axis (below), starting immediately after egg laying. At day 7, only control embryos for quantification of MT mRNA transcription and analysis of Cd concentrations were sampled. n is the number of clutches used for each exposure regime. (B) Exposure scheme of eggs from each clutch (left-hand) treated with control (Cd-free) solution (C) or with increasing nominal concentrations (5, 10 and 15 mg/L) of Cd; also shown are the numbers of eggs pooled (right-hand) to one sample at each of the days selected during the development.

Sample processing for Cd analysis

Pooled samples were oven-dried (50°C) and subsequently digested in 300 µL of nitric acid (HNO₃ 67-69%, quality Optima, for ultra traces analysis, Fisher Scientific) for 40 h at 60 °C. Finally, ultrapure water was added to a final volume of 15 mL. Cd concentrations in the samples were measured using ICP-MS (X series II, Thermo scientific, France). The reliability of the measurement procedure was assessed by applying different types of certified standard reference material such as dogfish liver (DOLT) and lobster hepatopancreas (TORT) (both: NRCC-CNRL, Canada).

Sample preparation for RT and qRT-PCR

Pooled samples were soaked in RNeasy (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and stored at -80°C. RNA isolation was performed using the RNeasy[®] Plus Micro Kit and the

RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The Quant-iT[™] RiboGreen RNA Assay Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used for RNA quantification after DNase I (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) digestion. 250 ng of RNA were applied in a 50 µl approach for cDNA synthesis using the RevertAid[™] H Minus M-MLV Reverse Transcriptase kit (Fermentas).

PCR and qRT-PCR of the three MT isoforms

The presence of MT isoform gene transcripts was investigated by means of PCR in 1 day, 6 day and 12 day-old embryos. Due to the low quantity of RNA available from pools of 15 one -day-old embryos, the four pools per treatment were merged to obtain one major pool of 60 embryos each for each of the four exposure concentrations. Hence, the PCR on one-day-old samples was performed on these 4 major pools of 60 embryos each. Yet, the small amount of tissue in these major pools did not permit to apply qRT-PCR. For the 6 and 12-day-old embryos, one pool of 3 eggs each was used to perform PCR. The gene-specific primers were designed as described by Höckner et al. (2011): for CdMT sense, 5'-GCC GCC TGT AAG ACT TGC A-3' and antisense, 5'-CAC GCC TTG CCA CAC TTG-3'; for CuMT: sense, 5'-AAC AGC AAC CCT TGC AAC TGT-3' and antisense: 5'-CGA GCA CTG CAT TGA TCA CAA-3'; for Cd/CuMT: sense, 5'-TGT GGA GCC GGC TGT TCT-3' and antisense: 5'-CAG GTG TCA TTG TTG CAT TGG-3'. Amplifications of the three different MT isoforms were performed with 1 µL (for 6 and 12 day samples) or 2 µL (for 1 day samples) of cDNA template, 0.5 µL of gene-specific sense and antisense primer (10 µM), 0.5 µL of dNTPs (10 mM) and 2.5 µL of 10X Taq Buffer), using 0.5 µL of Titanium[®] Taq DNA Polymerase (Clontech) to a final volume of 25 µL. The cycling parameters were as follows: one initial denaturation step of 2 min at 95 °C followed by 30 (or 35 for 1 day) cycles at 95 °C for 20 s, 54.3 (CdCuMT), 57.2 (CdMT) or 58.5 °C (CuMT) for 25 s, 68 °C for 30 s and a final extension of 10 min at 70 °C. Amplification products were visualized on 3% agarose gels stained with GelRed[™] (Biotum, Hayward, CA, USA) after an electrophoresis conducted at 110 V for 45 min. The amplicon lengths of the single MT isoform gene transcripts were 56 bp (CdMT), 74 bp (CuMT) and 59 bp (CdCuMT), respectively.

qRT-PCR was carried out according to the protocol reported by Höckner et al. (2011). Briefly, 2 µL of cDNA sample were applied in a 20 µL approach with the same primers as described by Höckner et al (2011), using a 7500 Real Time PCR analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with Power SYBR Green detection (Applied Biosystems). For each cDNA sample, qRT-PCR measurements were performed in triplicates. The efficiency of qRT-PCR reactions was between 95 and 99%. Established calibration

curves, resulting Δct values, primer design and concentrations were applied according to Höckner et al. (2011). The following primer concentrations were used: CdMT sense, 300 nM; CdMT antisense, 900 nM; CuMT sense, 900 nM; CuMT antisense, 900 nM and Cd/CuMT sense, 900 nM; CdCu/MT antisense, 300 nM.

Statistics

All statistical analyses were performed with R (2.13.2) (R Development Core Team, 2004, <http://www.R-project.org/>). The homogeneity and normality of data were tested using the Bartlett test and the Kolmogorov-Smirnov test, respectively. Since the data were not normally distributed, non-parametric tests were used for all statistical analyses. The Mann-Whitney U test was used to compare Cd accumulation in eggs for each solution (i.e., control versus 5 mg/L, 5 mg/L versus 10 mg/L, etc.) and qRT-PCR results. Kruskal-Wallis test was used to compare i) levels of Cd measured in eggs at each date for the same concentration of exposure (i.e., at 1, 6, 7 and 12 days for 5 mg/L exposure), ii) differences between the 3 *MT* gene transcript values of controls (comparisons of *CdMT*, *CuMT* and *CdCuMT* values at each day of development) iii) differences between expression values for a same gene with time of development were also tested by Kruskal-Wallis test. In all cases, statistical significance was set at $p < 0.05$.

III.3.1.3. Results

Cd concentration in eggs

Cd concentrations in metal-exposed eggs were significantly higher than in control eggs at each point of measurement ($W = 0$, $p < 0.001$ for the 3 exposure concentrations), with Cd concentrations amounting between 12.67 to 14.18 $\mu\text{g/g DW}$, 23.17 to 23.32 $\mu\text{g/g DW}$, and 37.04 to 37.99 $\mu\text{g/g DW}$ for eggs treated with 5, 10 and 15 mg Cd/L, respectively. Cd concentrations measured in eggs increased significantly in a dose-dependent manner (Cd in 15 mg/L-exposed eggs > 10 mg/L > 5 mg/L) (Tableau III-6). Over time of the experiment (from day 1 to 12) for a same concentration of exposure, no significant differences of Cd accumulation were found between eggs (Tableau III-6).

Tableau III-6 : Cadmium concentrations in eggs of *Cantareus aspersus* recorded throughout the duration of the experiment (0 – 12 days).

For each point of measurement, pooled samples from three replicate exposures were considered ($n = 3$), showing means and standard deviations (in brackets). Significant differences of values between single treatments and times were expressed by different superscript lower case letters (a, b, c, d) (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$). From day 1 to 12, egg concentrations remained near 12.5 $\mu\text{g/g}$ DW (KW = 0.71, $df = 3$, $p = 0.87$), 23 $\mu\text{g/g}$ DW (KW = 0.62, $df = 2$, $p = 0.73$), 40 $\mu\text{g/g}$ DW (KW = 3.84, $df = 3$, $p = 0.28$) for the 5, 10 and 15 mg Cd/L exposed eggs, respectively. All concentrations measured in eggs exposed to 15 mg/L were significantly higher than those exposed to 10 mg/L ($W = 78$, $p < 0.001$) or 5 mg/L ($W = 0$, $p < 0.001$). Concentrations in eggs exposed to 10 mg/L are also higher than those exposed to 5 mg/L ($W = 81$, $p < 0.001$).

Days of measurement		0	1	6	7	12
Cd concentration ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	Ctrl	0.01 (± 0.01)	0.08 ^a (± 0.13)	0.11 ^a (± 0.13)	0.14 ^a (± 0.04)	0.01 ^a (± 0.01)
	5mg/L	---	14.18 ^b (± 3.70)	12.67 ^b (± 1.32)	---	13.25 ^b (± 1.36)
	10mg/L	---	23.17 ^c (± 3.88)	23.32 ^c (± 3.57)	---	23.29 ^c (± 4.99)
	15mg/L	---	37.99 ^d (± 11.73)	37.04 ^d (± 8.88)	---	35.63 ^d (± 4.97)

Hatching success

The EC_{10} and EC_{50} values based on hatching success were 2.68 and 5.05 mg Cd/L, with confidence intervals (CI) of 95% from 2.05 to 3.32 and 4.41 to 5.79, respectively.

Expression of the three MT isoform genes

By means of RT PCR, the expression of the *CdMT* and *CdCuMT* genes, but not that of the *CuMT* gene, could be detected in 1-day-old embryos (exposed or not) (Figure III-20A). Only at the age of 6 days and thereafter were the three MT isoform genes altogether expressed in snail embryos (Figure III-20B). However, the intensity of PCR bands for the *CuMT* gene remained the lowest one in 6- and 12-day-old control samples compared to the bands for the other two MT genes. In contrast, the PCR band with the highest intensity throughout appeared to be that of the *CdCuMT* gene (Figure III-20B).

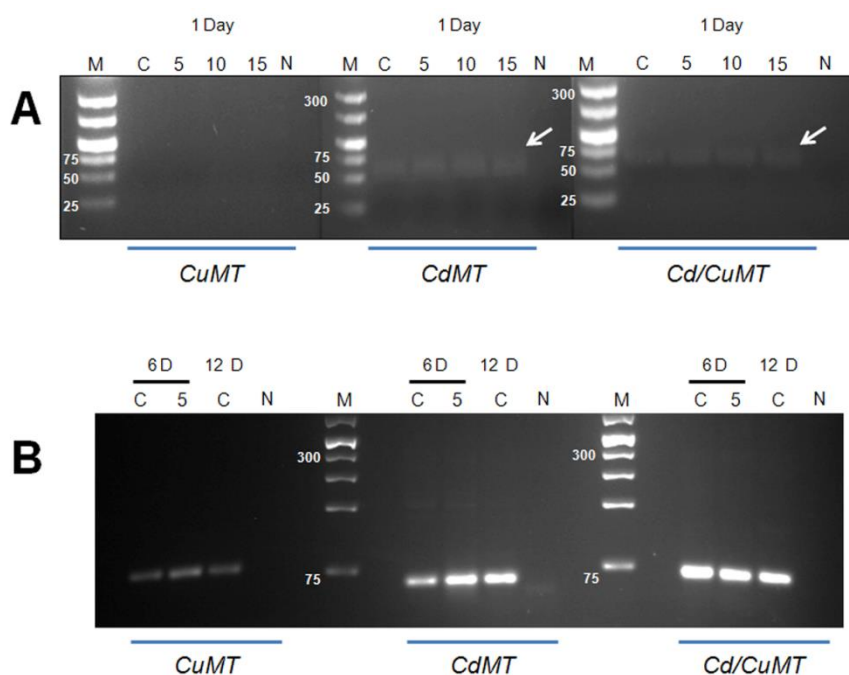


Figure III-20 : 3% agarose gels with visualization of PCR amplicon bands specific for the three MT isoform genes (*CuMT*, *CdMT* and *CdCuMT*) of *Cantareus aspersus* embryos.

(A) Detection of MT isoform gene amplification bands in 1 day old control eggs (C) or embryos exposed for one day to increasing Cd concentrations (5, 10, and 15 mg/L), along with DNA ladder bands (M) (Generuler Low range DNA ladder and 100pb plus DNA ladder, Thermo Scientific). N, negative control without sample DNA.

(B) Detection of MT isoform gene amplification bands in 6 day-old embryos (C, controls and embryos exposed to 5 mg Cd/L), or in 12 day-old embryos (C, controls only), along with DNA ladder bands (M: Generuler Low range DNA ladder and 100pb plus DNA ladder, Thermo Scientific). N, negative control without sample DNA.

As shown by qRT-PCR, constitutive transcription levels of all three MT isoform genes increased with development time (6, 7 and 12 days) in unexposed snail embryos (Kruskal Wallis (KW) = 8.01, df = 2, $p = 0.018$ between days 6 and 12) (Figure III-21). Over all three dates investigated (6, 7 and 12 days), the transcription values of the *CdCuMT* gene was significantly higher ($F = 9.33$, df = 2, $p < 0.0003$) than those of the 2 other two MT genes (*CdMT* and *CuMT*) (Figure III-19).

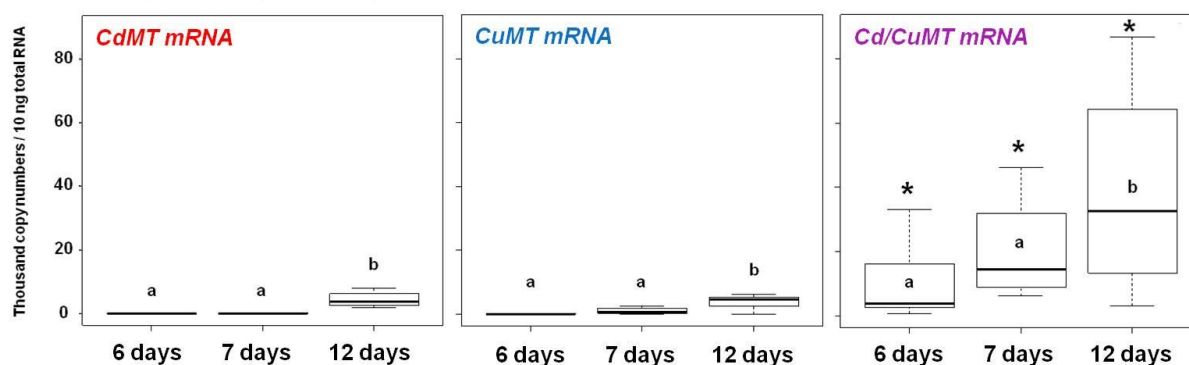


Figure III-21 : MT isoform mRNA transcription values for the *CdMT*, *CuMT* and *Cd/CuMT* genes of *Cantareus aspersus* in control (unexposed) eggs through embryonic development.

For each point of measurement $n = 4$. Values are given in thousand mRNA copy numbers/10 ng of total RNA. Box plots indicate the median values (bold line) for each group, the edges of the boxes are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. * Significant differences (Kruskal-Wallis test, $p < 0.03$) between *CdCuMT*, *CdMT* and *CuMT* values at 6, 7 and 12 days. Differing lower case letters (a, b) indicate significant differences between single values for each of the three *MT* isoform genes at days 6, 7 and 12 (Kruskal-Wallis test, $p < 0.02$).

In 6-day-old embryos exposed to Cd, a significant induction ($W = 0$, $p = 0.02$ for each concentration) of transcription levels was detected for *CdMT* mRNA, in contrast to the non-significant responses of the *CuMT* ($p > 0.11$) and the *CdCuMT* genes ($p > 0.69$) (Figure III-22).

This Cd-specific transcriptional induction of the *CdMT* gene was also observed in 12-day-old embryos (Figure III-23) exposed to 5 and 10 mg Cd/L ($W = 2$, $p = 0.05$; $W = 0$, $p = 0.01$, respectively). In contrast to the *CdMT* gene, the transcription rates of the *CuMT* and *Cd/CuMT* gene in 12-day-old embryos were not significantly induced by Cd at all ($p > 0.40$ and $p > 0.34$) (Figure III-23).

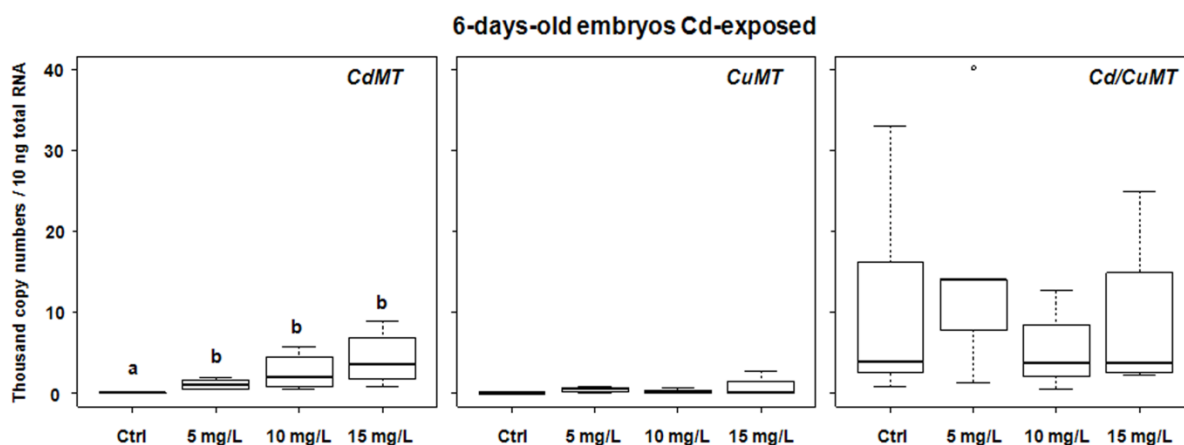


Figure III-22 : MT isoform mRNA transcription values of the *CdMT*, *CuMT* and *CdCuMT* genes in 6-day-old embryos of *Cantareus aspersus* exposed to Cd.

For each point of measurement $n = 4$. Values are given in thousand mRNA copy numbers/10 ng of total RNA. Box plots indicate the median values (bold line) for each group, the edges of the boxes are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The white dot is the extreme value. Ctrl: control; 5, 10 and 15 mg: 5, 10 and 15 mg/L of Cd. Significant differences (Mann-Whitney U test, $p < 0.003$) of transcription levels for the three *MT* isoform genes between control and exposed embryos are indicated by differing lower case letters (a, b).

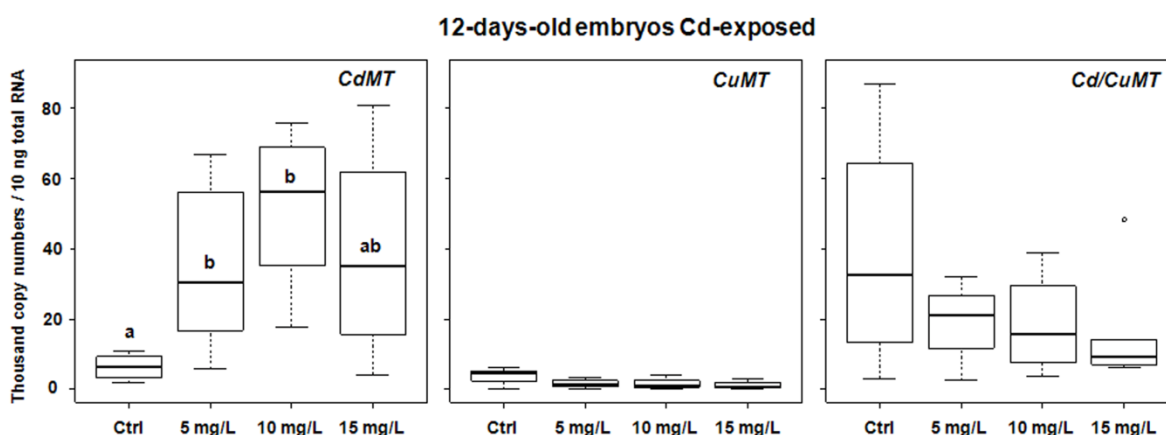


Figure III-23 : MT isoform mRNA transcription values of the *CdMT*, *CuMT* and *CdCuMT* genes in 12-day-old embryos of *Cantareus aspersus* exposed to Cd.

For each point of measurement $n = 4$. Values are given in thousand mRNA copy numbers/10 ng of total RNA. Box plots indicate the median values (bold line) for each group, the edges of the boxes are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The white dot is the extreme value. Ctrl: control; 5, 10 and 15 mg: 5, 10 and 15 mg/L of Cd. Significant differences (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$) of transcription levels of the three *MT* isoform genes are indicated by differing lower case letters (a, b).

III.3.1.4. Discussion

Expression pattern of MT isoform genes in unexposed embryos

In the present study, data on the expression pattern of the *CdMT*, *CuMT* and *CdCuMT* isoform genes in the ELS of the terrestrial snail *Cantareus aspersus* are shown for the first time. It appears that snail embryos are able to transcribe the *CdMT* and *CdCuMT* genes from the first 24 hours of their development, corresponding to the beginning of the morula stage (Druart et al., 2010). At the same time of development, no indication for an early expression of the *CuMT* gene was observed (Figure III-20). Our results are partially in accordance with studies by Russo et al. (2003, 2013) in the sea urchin *Paracentrotus lividus*, where a low expression rate of *MT* mRNA in eggs or embryos at the eight cells and morula stages was reported. On the other hand, the absence of *CuMT* gene expression in *C. aspersus* morula embryos indicates that at this early stage of development the cell-specific homeostatic regulation of Cu which is linked to the expression of *CuMT* in mollusk rhogocytes (Dallinger et al., 2005) may not be differentiated yet. Only from day 6 of embryonic development could the expression of the three snail *MT* isoform genes (*CdMT*, *CuMT* and *CdCuMT*) be observed altogether (Figure III-21), indicating that from this point of development, the metal regulation and detoxification capacities in *C. aspersus* embryos may be fully unfolded.

In fact, the stepwise increase of transcription levels of the three *MT* isoform genes from 6 to 12 days of development may be related to gradual tissue differentiation within this time (Figure III-21). Six-day-old snail embryos start their organogenesis by development of a primary foot, mouth, and anus, whereas after 12 days, embryos assume the appearance of small adult snails with the presence of all distinct parts of the body (shell, eyes, mantle, digestive glands, etc.) (Druart et al., 2010). In our experiments, twelve-day-old embryos were clearly more efficient in the expression of the three *MT* genes compared to earlier developmental stages (Figure III-21). Russo et al. (2013) attributed high levels of gene expression at the onset of the gastrulation stage of the sea urchin *P. lividus* to an increased requirement of *MT* mRNA due to the organization of new tissue territories. In *C. aspersus*, the gradual rise of *MT* isoform gene transcription over time of development of unexposed embryos proves the significance of constitutive *MT* gene expression, suggesting an important role of the three *MT* isoforms during the snail embryogenesis. For the very first stages of sea urchin embryogenesis, Russo et al. (2013) suggested a possible role of maternal *MT* mRNA supplies during oogenesis, giving rise to the early ability of *MT* expression in sea urchin embryos. Such a maternal *MT* mRNA stock might be used by the embryos for the purpose of metal homeostasis during early development when a high level of essential metals is needed

to cope with the requirements of rapid DNA synthesis and metabolic activity. In eggs of the marine mollusk *Crassostrea virginica*, Roesjadi et al. (1996) have also observed the presence of maternal *MT* mRNA which declines immediately after fertilization. In the case of *C. aspersus* embryogenesis too, a role of maternal *MT* mRNA during early development cannot be excluded, although the absence of *CuMT* mRNA transcription in one-day-old embryos does not support this hypothesis. Rather, the gradual increase of *MT* gene expression from six to twelve day old embryos can most likely be attributed to the rising ability of developing snails to transcribe the three *MT* genes constitutively by their own (Figure III-21). This suggests that the physiological capacity of metal regulation and detoxification may gradually increase throughout the snail embryogenesis, as similarly reported by Lemoine et al., (2000) for the marine mollusk *Mytilus edulis*.

In unexposed embryos of *C. aspersus*, the highest transcription rate among all three *MT* isoform mRNAs was that of the *CdCuMT* gene. This is interesting, since in adult snails, this same *MT* isoform gene is normally expressed at a much lower rate (Höckner et al. 2011). This suggests the marginal importance of this isoform gene in metal balance of adult snails, contrasting with its apparently more prominent physiological importance in developing snail embryos, perhaps in accordance with their increased metal homeostatic and metabolic requirements during development. Russo et al. (2013) suggested such a homeostatic role for *MTs* in sea urchin embryos too.

The involvement of *MT* genes and proteins during development has also been suggested for several vertebrate species. Olsson et al. (1990), for example, have suggested an important role of *MT* genes during development and differentiation in the ELS of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Moreover, a significant function has also been attributed to *MTs* in the embryonic brains of the amphibian *Xenopus laevis* (Durliat et al., 1999) and the lizard *Podarcis sicula* (Simoniello et al., 2010). The increase of *MT* mRNA in lizard embryos at hatching was attributed to the fact that at this point the developing organism switches from a closed system to an open system physiology owing to the loss of eggshell protection.

Up-regulation of *MT* genes in Cd-exposed embryos

The present study shows that during exposure of snail embryos to Cd over 24 hours, the metal is taken up from the exposure solution by the entire egg (shell, albumen and embryos). In fact, Cd concentrations in eggs of *Cantareus aspersus* after this short-term exposure remained elevated and stable throughout the 12 days of the experiment (Tableau III-6). On the other hand, Cd concentrations in eggs of the present study revealed a dose-dependent metal uptake (Tableau III-6). Cd concentrations measured in one-day-old eggs most likely represent

the metal load present in the eggshell. According to the distribution of Cd in eggshell and albumen after 7 days of exposure reported by Druart et al. 2010, in 6, 7 and 12-day-old eggs, however, Cd concentrations analyzed may possibly reveal the metal content of the albumen. This may be due to the time required by Cd to diffuse throughout the different parts of the egg, thereby exerting toxic effects on snail embryos. The significant up-regulation of the *CdMT* gene transcription at 6 days of development provides evidence, in any case, that the Cd has by this time reached the embryonic tissue, which responds to the metal insult by *CdMT* gene expression.

Overall, this study provides the first data on the expression and up-regulation of *MT* genes in the ELS of a terrestrial snail (*C. aspersus*) exposed to Cd (Figure III-22 and Figure III-23). In both, six-day-old and 12-day-old exposed embryos, a dose-dependent up-regulation of the *CdMT* gene was found, with the only exception shown for 12-day-old embryos at the highest Cd exposure concentration, where the *CdMT* mRNA transcription level did not increase any more compared to lower exposure concentrations (Figure III-23). A rapid induction of *MT* expression was also reported by Roesijadi et al. (1996) for Cd-exposed embryos of *C. virginica*. However, the *MT* gene induction in oyster eggs occurred at a faster rate compared to that observed in the snail eggs of the present study, likely because oyster eggs were directly exposed to the metal through the contaminated seawater and thus experienced a faster Cd transfer into the embryonic cells.

Whereas Roesijadi et al. (1997a) have associated the increased *MT* gene expression of *C. virginica* in response to Cd exposure with the ability of this species to protect itself from metal toxicity, Meistertzheim et al. (2009) have hypothesized that in the Pacific oyster (*C. gigas*), high *MT* levels may enable embryos of this species to survive in stressful environments. In many species, however, exposure to toxic metals directly leads to an increase of *MT* gene transcription (Lemoine et al., 2000). In the present study too, the increase in transcription rates of the Cd-specific *MT* isoform gene upon exposure to this metal demonstrates the ability of premature (6 day-old) snail embryos to immediately respond to the Cd stress by synthesizing a metal-specific *MT* isoform able to inactivate the metal by detoxification. The fact that in 12-day-old embryos exposed to the highest Cd concentration (15 mg/L) the mRNA copy numbers of the *CdMT* gene did not exceed the respective transcription rates observed at lower exposure concentrations (5 and 10 mg Cd/L) (see Figure III-23) perhaps indicates that at this highest exposure concentration, Cd may start to exert toxic effects which cannot be compensated any more by *CdMT* expression. Indeed, our results show that at an exposure concentration of 15 mg Cd/L, the hatching success (at 20 days) of snail embryos is completely inhibited. Therefore, our interpretation is that at this high Cd

concentration, embryos lost their ability to further up-regulate the Cd-specific *MT* gene and hence, their defense capacities became overloaded. Chabicowski et al. (2004) have shown that in adult Roman snails (*Helix pomatia*) exposed to increasing Cd concentrations CdMT overloading is accompanied with an increase of individual mortality. Interestingly, Roesijadi et al. (1997b) also observed, in a similar manner as in the present study, a decrease of *MT* mRNA inducibility in hemocytes of *C. virginica* exposed to Cd *in vitro* above a threshold concentration of 35 μ M.

In the present study, the expression pattern of the three *MT* isoform genes in Cd-exposed embryos of *C. aspersus* is similar to that reported earlier by Höckner et al. (2011) for adult snails. In both cases, Cd-specific induction was only seen for the *CdMT* gene, whereas no metal-responsive increase of transcription rates was observed for the *CuMT* and the *CdCuMT* genes (see Figure III-22 and Figure III-23). Whilst the lacking inducibility of the *CuMT* gene by Cd exposure may be understandable because of its exclusive Cu specificity (Palacios et al. 2011), the inability of the *CdCuMT* gene to respond at the transcriptional level to Cd stress is more surprising. In fact, the expressed CdCuMT isoform is able to bind both, Cd²⁺ and Cu⁺ ions simultaneously upon metal exposure (Hispard et al., 2008). Hence, it has to be assumed that in spite of the lacking metal-dependent inducibility of this gene, its constitutive expression in snail embryos may be sufficient to make it available as a Cu⁺ and Cd²⁺ binding ligand for purposes of metal regulation and detoxification, respectively. At least, our data suggest that this *MT* isoform gene must play, due to its elevated transcription rate, a so far unknown, but perhaps important role in snail embryogenesis.

III.3.1.5. Conclusion

The present study reveals the early capacity of developing embryos of the terrestrial snail *Cantareus aspersus* to: (i) constitutively express the three characteristic MT isoform genes (*CuMT*, *CdMT* and *CdCuMT*) with (ii) a higher transcription level for the unspecific *Cd/CuMT* gene compared to that known from adult snails; and (iii) a Cd-specific response of the *CdMT* gene by increased transcription rates upon metal exposure during embryogenesis. Because of this, the ELS of *C. aspersus* may be used in ecotoxicological studies, e.g. by quantification of the *CdMT* gene expression as a biomarker of Cd exposure. As to the high constitutive expression level of the *CdCuMT* isoform gene, a possible role of this gene during embryogenesis must be considered. Overall, the present findings may constitute a first step towards better understanding the high Cd tolerance of the ELS in this terrestrial snail species.

III.3.1.6. Acknowledgments

This work was supported by project No. P 23635-B20 granted by the Austrian Science Foundation to R. Dallinger. Authors from the University of Innsbruck are members of “Centre of Molecular Biosciences Innsbruck” (CMBI). Authors also thank the Conseil Régional de Franche-Comté, the Ecole Doctorale Environnement-Santé and the University of Franche-Comté for funding this work.

III.3.1.7. References

- Baird, S.K., Kurz, T., Brunk, U.T., 2006. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem. J.* 394, 275–283.
- Baurand, P.-E., Capelli, N., Scheifler, R., De Vaufléury, A., 2014. An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization. *Submitted*
- Baurand, P.-E., de Vaufléury, A., Scheifler, R., Capelli, N., 2013. Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analysis and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9505–9513.
- Blindauer, C.A., Leszczyszyn, O.I., 2010. Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. *Nat. Prod. Rep.* 27, 720–741.
- Chabicoovsky, M., Niederstatter, H., Thaler, R., Hodl, E., Parson, W., Rossmanith, W., Dallinger, R., 2003. Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190, 25–36.
- Chabicoovsky, M., Klepal, W., Dallinger, R., 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: Programmed cell death and metallothionein overload. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 648–655.
- Dallinger, R., 1996. Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C (2), 125–133.
- Dallinger, R., Wieser, W., 1984. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 79C (1), 117–124.
- Dallinger, R., Berger, B., Bauer-Hilty, A., 1989. Purification of cadmium-binding proteins from related species of terrestrial helicidae (Gastropoda, Mollusca): A comparative study. *Mol. Cell. Biochem.* 85, 135–145.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P.E., Birchler, N., Hauer, C.R., Kägi, J.H.R., 1993. Purification and primary structure of snail metallothionein – Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A. *Eur. J. Biochem.* 216, 739–746.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P.E., Kägi, J.H.R., 1997. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature (London)* 388 (6639), 237–238.
- Dallinger, R., Chabicoovsky, M., Hödl, E., Prem, C., Hunziker, P., Manzl, C., 2005. Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. *Am. J. Physiol.* 189 (4), R1185–R1195.
- Druart, C., Scheifler, R., De Vaufléury, A., 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *J. Hazard. Mater.* 184: 26–33.
- Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., De Vaufléury A., 2012. Landsnail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. *Appl Soil Ecol* 53: 56–64.
- Durliat, M., Muller, J.-P., Andre, M., Wegnez, M., 1999. Expression of the *Xenopus laevis* metallothionein gene during ontogeny. *Int. J. Dev. Biol.* 43: 575–578.
- Egg, M., Höckner, M., Brandstätter, A., Schuler, D., Dallinger, R., 2009. Structural and bioinformatic analysis of the Roman snail Cd-Metallothionein gene uncovers molecular adaptation towards plasticity in coping with multifarious environmental stress. *Mol. Ecol.* 18, 2426–2443.
- Egli, D., Yepiskoposyan, H., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Rajaram, R., Simons, A., Multhaup, G., Mettler, S., Varadanyan, A., Georgiev, O., Schaffner, W., 2006. A family knockout of all four

- Drosophila* metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. *Mol. Cell. Biol.* 26 (6), 2286-2296.
- Enserink, L., Luttmer, W., Maas-Diepeveen, H., 1990. Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* 17, 15-26.
- Fu, C., Miao, W., 2006. Cloning and characterization of a new multi-stress inducible metallothionein gene in *Tetrahymena pyriformis*. *Protist* 157 (2), 193-203.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11: 403-416.
- Hispard, F., Schuler, D., De Vauflery, A., Scheifler, R., Badot, P.-M., Dallinger, R., 2008. Metal distribution and Metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropods, Pulmonata) *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (7), 1533-1542.
- Höckner, M., Stefanon, K., de Vauflery, A., Monteiro, F., Pérez-Rafael, S., Palacios, Ò., Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Physiological relevance and contribution to metal balance of specific and non-specific metallothionein isoforms in the garden snail, *Cantareus aspersus*. *Biomaterials* 24, 1079-1092.
- Kägi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205, 613-626.
- Kägi, J.H.R., 1993. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins. An overview. In: Suzuki, K.T., Imura, N., Kimura, M., (Eds.), *Metallothionein III - Biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 29-55.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (3), 215-220.
- Lemoine, S., Bigot, Y., Sellos, D., Cosson, R.P., Laulier, M., 2000. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, bivalvia): Complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *Mar. Biotechnol.* 2, 195-203.
- Meistertzheim, A.-L., Lejart, M., Le Goïc, N., Thébault, M.-T., 2009. Sex, gametogenesis, and tidal height-related differences in levels of HSP70 and metallothioneins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 152: 234-239.
- Olsson, P.E., Zafarullah, M., Foster, R., Hamor, T., Gedamu, L., 1990. Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.* 193:229-235.
- Palacios, Ò., Pagani, A., Pérez-Rafael, S., Egg, M., Höckner, M., Branstätter, A., Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Shaping mechanisms of metal specificity in a family of metazoan Metallothioneins: evolutionary differentiation of mollusc Metallothioneins. *BMC Biol.* 2011, 9:4.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E., 1996. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140: 356-363.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E., 1997a. Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aqua. Toxicol.* 39: 185-194.
- Roesijadi, G., Brubader, L.L., Unger, M.E., Anderson, R.S., 1997b. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium *in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 118, 171-176.
- Russo, R., Bonaventura, R., Zito, F., Schroder, H.-C., Muller, I., et al., 2003. Stress to cadmium monitored by metallothionein gene induction in *Paracentrotus lividus* embryos. *Cell Stress Chaperones* 8: 232-241.
- Russo, R., Zito, F., Matranga, V., 2013. Tissue-specificity and phylogenetics of PI-MT mRNA during *Paracentrotus lividus* embryogenesis. *Gene* 519: 305-310.
- Salice, C.J., Roesijadi, G., 2002. Resistance to cadmium and parasite infection are inversely related in two strains of a freshwater gastropod. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (7), 1398-1403.
- Scheifler, R., Gomot-de Vauflery, A., Badot, P.-M., 2002. Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: Bioaccumulation and effects. *Ecotox. Environ. Saf.* 53, 148-153.
- Simoniello, P., Motta, C.M., Scudiero, R., Trinchella, F., Filosa, S., 2010. Spatiotemporal changes in metallothionein gene expression during embryogenesis in the wall lizard *Podarcis sicula*. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 313, 410-420.

Cette partie du 2^{ème} chapitre est composée de 2 projets de publications courtes rédigés en anglais.

III.3.2. Differential sensitivity of snail's embryos to Cd: relation with age and MT genes expression

Le premier projet a pour but de déterminer : 1 / si la sensibilité des embryons au Cd est dépendante du stade de développement lors de l'exposition et 2 / s'il existe un lien avec des capacités d'expression différentes des gènes des *MTs* et les concentrations en Cd des oeufs. Cette partie concerne les résultats de toxicité (basée sur le succès d'éclosion) et d'expression des 3 isogènes de *MTs* chez des embryons exposés après 6 jours de développement durant 24h aux mêmes concentrations de Cd (5 à 15 mg/L) que dans la première publication de ce chapitre.

Résumé

Dans l'environnement, les organismes peuvent être exposés à des contaminants à divers moments de leur cycle de vie. Les métallothionéines (*MTs*) sont des protéines connues chez de nombreux organismes et impliqués dans la détoxification des métaux connus chez des nombreux organismes. La présence de 2 des 3 isogènes des *MTs* a été démontrée chez l'embryon d'*H. aspersa* dès 1 jour. Les données d'expression de ces gènes sont connues à 6 et 12 jours chez des embryons exposés 24 h au Cd (5, 10 et 15 mg/L) au début de l'embryogenèse (cf III.1.1). Cependant aucune donnée n'est disponible à l'heure actuelle sur les variations de la sensibilité au Cd des embryons d'escargots au cours de leur développement embryonnaire. De même, l'évolution au cours du temps des capacités de détoxification mettant en jeu les *MTs* chez les embryons d'escargots ne sont pas connues. Le but de cette étude est de déterminer la toxicité du Cd et les niveaux d'expressions des 3 gènes des *MTs* chez des embryons exposés au Cd à partir de 6 jours de développement. Ces données seront ensuite comparées avec les valeurs obtenues chez des embryons exposés juste après la ponte. Des embryons ont été exposés avec les mêmes modalités que Baurand et al. (2014b) (durée d'exposition et concentrations) au début du stade larvaire (6 jours) pendant 24 h. L'ARN des embryons a été extrait aux jours 7 et 12 et l'expression des 3 gènes de *MT* a été étudiée par qRT-PCR. Les embryons exposés plus tardivement au cours de l'embryogenèse (à 6 jours) montrent une sensibilité plus faible au Cd (EC_{50} (6j)-24 h = 9,48 mg/L ($IC_{95\%}$: 7,84 – 11,23) comparativement aux embryons exposés juste après la ponte (EC_{50} (0j)-24 h = 5,05 mg/L ($IC_{95\%}$: 4,41 – 5,69). Nos mesures montrent une accumulation du Cd dépendante de la

concentration d'exposition. Ces concentrations sont proches de celles d'œufs exposés en début d'embryogenèse (Baurand et al., 2014). Les données d'expression à 7 jours montrent que les embryons sont capables de répondre rapidement à un stress au Cd en surexprimant le gène *CdMT*. Les données à 12 jours indiquent que les embryons exposés tardivement ont des capacités de réponse vis-à-vis du Cd plus importante (à 15 mg/L) que les embryons exposés en début de développement. Les résultats de cette étude suggèrent un lien entre les différences de sensibilité au Cd de ces 2 stades de développement et leur capacité de synthèse des MTs.

Mots clés : cadmium, stade embryonnaire, détoxification, sensibilité, embryotoxicité

III.3.2.1. Introduction

Metallothioneins (MTs) are proteins that specifically bind metal ions (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{+}) via the sulphur atoms on their abundant cysteine residues (Kägi 1993). Adults of terrestrial snail species possess three MT isoforms; two of them have metal-selective features and perform metal-specific tasks (Dallinger et al. 1997). One of these isoforms is Cd-selective and is involved in the detoxification of this metal in digestive tissues (Chabicovsky et al. 2003); the other is Cu-selective and devoted to the regulation of Cu associated with haemocyanin synthesis (Dallinger et al. 2005). The third is a non-specific MT isoform (Cd/CuMT) that is expressed constitutively at basal levels (Hispard et al. 2008; Höckner et al. 2011).

The presence of these 3 *MT* isogenes was demonstrated for the first time in unexposed developing *C. aspersus* embryos from day 6 of development (Baurand et al. 2014). Additionally, a recent study provided data about Cd embryotoxicity based on hatching success by exposing embryos to 5, 10, or 15 mg/L for 24 hours at the beginning of embryogenesis ($\text{EC}_{50-t0} = 5.05$ mg/L, $\text{CI}_{95\%}$: 4.4 – 5.7; Baurand et al. 2014). This work also demonstrated that the *CdMT* gene was upregulated at all concentrations tested after 6 and 12 days of exposure, except 12-day-old embryos exposed to 15 mg Cd/L.

Few studies focus on age-dependent variations of embryonic sensitivity to pollutants, yet in the field, embryos are exposed at different developmental stages. Hamm and Hinton (2000) found that medaka embryos exposed to 26 ppm diazinon early in their development are more sensitive than embryos exposed at the same concentration later in embryogenesis. No data are available on age-dependent sensitivity to toxicants or on age-dependent *MT* gene expression for *C. aspersus* embryos.

Thus, the aim of this study is to assess Cd toxicity (EC_{50-t6}) and the expression 3 metallothionein isogenes in embryos exposed to Cd on day 6 of development. Possible

relationships between Cd concentration in eggs, toxicity and *MT* gene expression will be investigated. Then, data will be compared with what is already known about embryos exposed at the beginning of embryogenesis (Baurand et al. 2014).

III.3.2.2. Materials and Methods

Exposure and sampling were performed on the same clutches, with the same Cd solutions and using the same experimental design as in Baurand et al. (2014), which exposed eggs just after egg laying. In the present study, 6-day-old embryos were used.

Chemicals and Cd analysis

Nominal Cd concentrations were 5, 10 and 15 mg Cd/L. Actual concentrations measured by ICP-AES (ICAP 6000 series model radial, Thermo scientific, France) were 3.8, 8.7 and 13.1 mg/L Cd. The Cd concentrations in eggs were measured using ICP-MS (X series II, Thermo scientific, France).

Exposure device

Eggs were obtained by our standardised laboratory rearing protocols and were exposed using the liquid phase bioassay as previously described (Baurand et al. 2014). In the present study, egg exposures were performed on half of the same four clutches used by Baurand et al. (2014).

After 6 days of development (i.e., until beginning of organogenesis), clutches were separated into 4 groups and exposed for 24 hours to the 3 Cd treatments (5, 10 and 15 mg Cd/L). Eggs incubating in demineralised water were used as the control. Then, eggs were placed on filter paper moistened with demineralised water until the end of developmental period. After twenty days of development, the mean hatching success for each concentration and the EC₅₀ were determined. The results were considered valid if the hatching success of controls was at least 70% (the average value observed in our laboratory rearing for controls).

Sampling dates

To measure Cd in whole eggs (eggshells, albumen and embryos), 5 eggs were pooled from each clutch at 7 and 12 days (i.e., 1 or 6 days post exposure). Each pool of 5 eggs corresponded to one Cd measurement.

For each Cd concentration tested, albumin extracted from pools of 3 embryos from each of the four clutches was used. Samples were stored at -80 °C in a RNA stabilisation solution (RNAlater®, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sample preparation for expression measurements of MTs gene expression

RNA isolation, reverse transcription and quantitative PCR measurements on samples from days 7 and 12 were performed as detailed in Baurand et al. (2014).

Statistics

All statistical analysis was performed using R (2.13.2) (R Development Core Team, 2004, <http://www.R-project.org/>). Comparisons of Cd accumulation in eggs as well as qPCR results were evaluated using the Mann-Whitney *U* test. In all cases, statistical significance was defined at $p < 0.05$. The dose-dependent curves and the EC_{10} and EC_{50} values were determined using Hill's model in the Excel Regtox macro, free version EV6.1.

III.3.2.3. Results and discussion

Hatching success

After 20 days, The EC_{50-16} was 9.5 mg Cd/L with a 95% confidence interval (CI) from 7.8 to 11.2. Thus, these embryos are less sensitive than embryos exposed to Cd at day 0, which have an $EC_{50-10} = 5.05$ mg/L ($CI_{95\%}$: 4.4 – 5.7) as found by Baurand et al. (2014).

Cd accumulation in eggs

Cd concentrations measured in eggs exposed at 5, 10 and 15 mg/L were significantly higher than in control eggs (Table 1; $W = 0$, $p < 0.005$ for the 3 exposure concentrations). Cd concentrations in eggs increased significantly in a concentration-dependent manner (Table 1). During the course of the experiment (between day 7 and 12), no significant differences in Cd accumulation in eggs were found within the exposure concentrations (Table 1).

As found by Baurand et al. (2014), a concentration-dependent transfer of Cd into eggs occurred in samples exposed to the same concentrations from the 1st day of development. The Cd accumulation in eggs on day 12 in the present study is similar to that of Baurand et al. (2014) in eggs exposed earlier (12.5, 23 and 40 $\mu\text{g/g}$ of Dry Weight (DW) for the 5, 10 and 15 mg Cd/L exposed eggs, respectively).

Tableau III-7 : Cadmium concentrations in eggs ($\mu\text{g/g}$ dry weight) and transcription of MT genes (mRNA copy number/10 ng of total RNA) in *Cantareus aspersus* embryos exposed to Cd upon the 6th day of development and sampled 1 or 6 days later (i.e. at 7 to 12 days).

For each point of Cd measurement in eggs, pooled samples from three replicate exposures were considered ($n = 3$). Mean values and standard deviations in brackets are given. For each gene expression measurement four replicate exposure were considered ($n = 4$). Mediane values and minimum / maximum in brackets are given. Significant differences of Cd values in eggs between single treatments and times were expressed by different superscript lower case letters (a, b, c, d) (Mann-Whitney U test, $p < 0.002$). From day 7 to 12, egg concentrations remained near 11 $\mu\text{g/g}$ DW ($W = 7$, $p = 0.4$), 23 $\mu\text{g/g}$ DW ($W = 6$, $p = 0.7$), 40 $\mu\text{g/g}$ DW ($W = 7$, $p = 0.4$) for the 5, 10 and 15 mg Cd/L exposed eggs, respectively. All concentrations measured in eggs exposed to 15 mg/L were significantly higher than those exposed to 10 mg/L ($W = 34$, $p < 0.009$) or 5 mg/L ($W = 0$, $p < 0.002$). Concentrations in eggs exposed to 10 mg/L are also higher than those exposed to 5 mg/L ($W = 36$, $p < 0.002$). A and B: significant differences (Mann-Whitney U test, $p < 0.03$) of *CdMT* expression Cd-exposed embryos compared with control.

		Days 7		12	
Cd concentration in eggs ($\mu\text{g/g}$ dry weight)		Ctrl	a 0.14 (+/- 0.04)	a 0.01 (+/- 0.01)	
		5mg	b 11.88 (+/- 2.72)	b 10.30 (+/- 1.86)	
		10mg	c 23.28 (+/- 6.97)	c 21.71 (+/- 6.57)	
		15 mg	d 45.25 (+/- 9.46)	d 36.32 (+/- 9.52)	
Copy numbers / 10 ng total RNA	<i>CdMT</i>	Ctrl	A 108 (21 - 214)	A 6,309 (2,092 - 10,749)	
		5mg	A 1,732 (134 - 4,986)	A 37,234 (9,988 - 53,899)	
		10 mg	B 2,648 (1,682 - 6,011)	A 26,349 (9,489 - 92,803)	
		15 mg	B 1,157 (425 - 3,732)	B 6,6743 (15,626 - 156,959)	
	<i>CuMT</i>	Ctrl	590 (29 - 2,549)	5285 (134 - 14,939)	
		5mg	796 (293 - 1,935)	1266 (559 - 17,728)	
		10 mg	692 (510 - 3,557)	2853 (234 - 11,963)	
		15 mg	1237 (481 - 2,188)	1673 (186 - 5,908)	
	<i>CdCuMT</i>	Ctrl	14,583 (6,361 - 46,150)	32,641 (3,169 - 86,545)	
		5mg	12,132 (8,796 - 37,610)	23,029 (3,334 - 92,949)	
		10 mg	10,356 (10,261 - 22,114)	31,673 (6,061 - 57,151)	
		15 mg	17,783 (6,361 - 46,898)	16,572 (2,704 - 32,167)	

Expression of the three MT isoform genes in cadmium-exposed embryos

In 7-day-old embryos exposed to Cd (Tableau III-7), *CdMT* mRNA levels was significantly induced at 10 and 15 mg/L ($W = 0$, $p = 0.03$ and $p = 0.02$, respectively) compared to the control level but not at 5 mg/L ($W = 1$, $p = 0.06$). *CuMT* ($p > 0.7$), and the mixed ($p > 0.3$) isogenes did not exhibit significant responses. These results demonstrate that

7-day-old embryos are able to respond specifically and rapidly to Cd stress by over-expressing the *CdMT* gene. This result also demonstrates that Cd quickly reached the embryos that responded to this metal within 24 hours of exposure. Ragusa et al. (2012) have shown that 3 *MT* isogenes in *P. lividus* embryos were only activated in response to Cd and that each of them possesses its own activation threshold. In snail embryos, the possibility of a Cd exposure concentration threshold that triggers *MT* genes expression once exceeded also exists. This hypothesis could explain the non-significant induction of the *CdMT* gene at 5 mg/L.

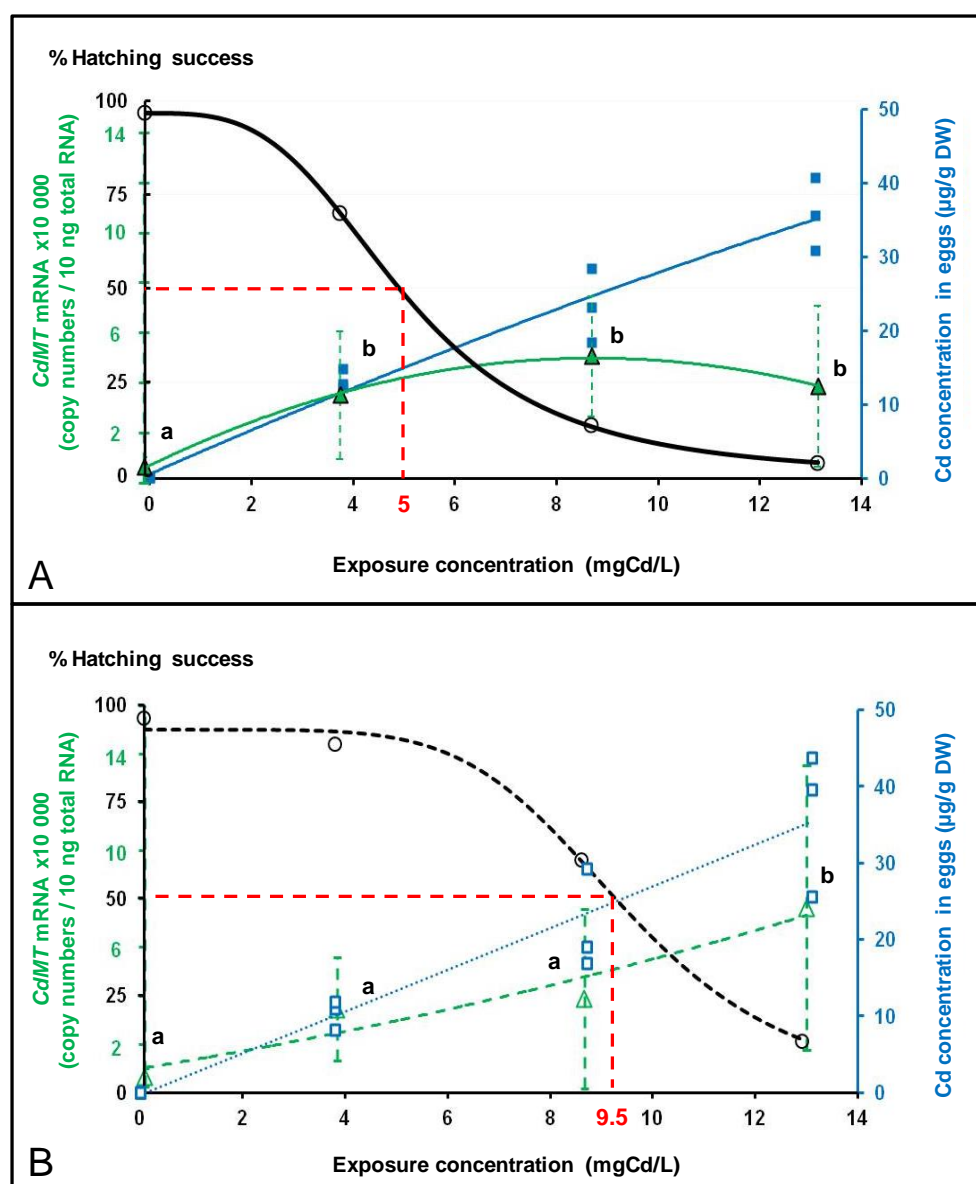


Figure III-24 : Comparisons of results obtained for the 2 stages of development studied in fonction of Cd real exposure concentrations.

A: results adapted from Baurand et al. 2014 for t0-Cd-exposed embryos. B: present data obtained for t6 Cd-exposed embryos. X axis gives the Cd exposure concentration in mg/L. Expression level of *CdMT* gene in 12 days-old embryos is represented in green. Each green triangle represents mean value with SD in green dash. Cd concentrations in eggs at 12 days are plotted in blue. Each blue square represents one Cd measurement. Black lines represent the dose-response curve based on hatching success. The EC_{50} values are indicated in red. a, b: significant difference of *CdMT* gene expression in Cd-exposed embryos compared to the control.

In 12-day-old embryos (Tableau III-7) the *CdMT* gene is significantly over-expressed at 15 mg Cd/L ($W = 0$, $p = 0.03$) but not at the other exposure concentrations ($W = 1$, $p = 0.06$ for 5 and 10 mg Cd/L). The expression of the *CuMT* and the *Cd/CuMT* genes ($p > 0.49$ for the 2 genes) did not show a significant induction compared to the controls. *CdMT* expression is different in 12-day-old embryos exposed on day 0 (Figure III-24A and B) ; as Baurand et al. (2014b) have shown over-expression at the first two concentration (5 and 10 mg/L); however, embryos did not significantly over-express the *CdMT* gene at the highest concentration (15 mg/L). Our present results show that 12-day-old embryos exposed on day 6 more efficiently respond to Cd by overexpression of the *CdMT* gene than embryos exposed to the same Cd concentration on day 0 (Figure III-24A and B). Regarding Cd accumulation in eggs and *CdMT* gene expression, the results suggest the existence of a Cd-exposure concentration threshold that significantly induces *CdMT* gene expression in 12-day-old embryos exposed on day 0 or day 6. For t0-Cd-exposed embryos, this threshold is lower than 5 mg/L (Figure 1A), and when the Cd concentration in eggs nears 15 µg/g DW, the expression values for *CdMT* gene reach a plateau at a copy number of 40,000. For t6-exposed embryos, this threshold is between 9 and 13 mg/L for a Cd concentration in eggs near to 25 µg/g DW, and the *CdMT* mRNA copy number was 40,000 (Figure III-24B). However, for t6-exposed embryos, the *CdMT* mRNA level did not reach the maximum level as in embryos t0-exposed.

In the present study, 12-day-old embryos exposed at t6 express the *CdMT* gene at 15 mg Cd/L. They show an enhanced ability to respond to Cd compared to embryos t0-exposed. These differences are related to more efficient Cd detoxification. Thus, in t0-exposed embryos saturation of *MT* expression could occur at lower exposure concentration, which would explain their higher sensitivity to Cd. Further studies are needed to verify that MT protein levels correlate with the mRNA levels found in our present work.

III.3.2.4. Conclusion

This work provides evidence of differential Cd sensitivity in early life stages evidenced by responses measured both at the individual level (hatching success) and at the infra-individual level (mRNA-MTs) in relation to Cd concentration in snail eggs. The sensitivity was found to increase with age and stage of *C. aspersus* development at time of exposure. The differential concentration-dependant expression of the *CdMT* gene in 12-day-old embryos could be another indication of age-dependent sensitivity (Figure III-24).

III.3.2.5. Acknowledgements

This work has been funded by the Conseil Régional de Franche-Comté, the Ecole Doctorale Environnement-Santé, the University of Franche-Comté and by the Austrian Science Foundation (FWF project No. P 23635-B20 to R.D.)

III.3.2.6. References

- Baurand, P.-E., De Vaufléury, A., Scheifler, R., Capelli, N., 2013. Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analysis and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47: 9505–9513.
- Baurand, P.-E., Pedrini-Martha, V., De Vaufléury, A., Niederwanger, M., Capelli, N., Scheifler, R., Dallinger, R. 2014. Differential expression of metallothionein isoforms in snail embryos reflects early life stage adaptation to metal stress. Submitted
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P.E., Kägi, J.H.R., 1997. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature (London)* 388(6639), 237–238.
- Hamm, J.T., Hinton, D.E., 2000. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquat. Toxicol.* 48, 403–418.
- Hispard, F., Schuler, D., De Vaufléury, A., Scheifler, R., Badot, P.-M., Dallinger, R., 2008. Metal distribution and Metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropods, Pulmonata) *Environ. Toxicol. Chem.* 27(7), 1533–1542.
- Höckner, M., Stefanon, K., de Vaufléury, A., Monteiro, F., Pérez-Rafael, S., Palacios, Ò, Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Physiological relevance and contribution to metal balance of specific and non-specific metallothionein isoforms in the garden snail, *Cantareus aspersus*. *Biomaterials* 24, 1079–1092.
- Kägi, J.H.R., 1993. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins. An overview. In: Suzuki, K.T., Imura, N., Kimura, M. (Eds.), *Metallothionein III - Biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 29–55.
- Ragusa, M.A., Costa, S., Gianguzza, M., Roccheri, M.C., Gianguzza, F., 2012. Effects of cadmium exposure on sea urchin development assessed by SSH and RT-qPCR: metallothionein genes and their differential induction. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2157–2167.

III.3.3. Metallothionein genes expression in embryos of terrestrial snails *Cantareus aspersus* exposed to cadmium and copper

Ce second projet de publication courte a pour but d'étudier la spécificité de réponse des 3 gènes des *MTs* ainsi que l'influence du mode d'exposition des embryons sur les réponses de ces 3 gènes. Cette partie présente les résultats d'expression des 3 isogènes de *MTs* chez des embryons après 20 jours de développement en exposition continue au Cd et à de la Bouillie Bordelaise (20% de Cu).

Résumé

Les embryons d'escargot *H. aspersa* ont la capacité de répondre au Cd en surexprimant le gène spécifique de la *CdMT*. L'isogène *CdCuMT*, codant l'isoforme mixte qui présente une structure lui conférant à priori la capacité de lier des atomes de Cu et de Cd, ne semble pas induit par une exposition de 24h au Cd, de même que le gène *CuMT* (cf III.3.1). Les taux de transcrits des 3 isogènes des *MTs* ne sont pas connus suite à une exposition continue au Cd, de même que lors de l'exposition à un autre contaminant métallique, le cuivre sous sa forme utilisée dans un fongicide : la Bouillie Bordelaise (20% de Cu). Notre but est d'étudier la spécificité de réponse des 3 gènes des *MTs* et l'influence des modalités d'exposition sur l'expression des isogènes de *MTs*. Pour cela, l'expression des 3 gènes des *MTs* après 20 jours d'exposition à ces 2 contaminants a été analysée. Des œufs ont été exposés en continu jusqu'à éclosion (20 jours) à 2, 4 et 6 mg/L de Cd et à 2,5 et 7,5 g/L de BB (0,5 et 1,5 g/L de Cu). Des mesures d'expression des 3 gènes de *MTs* ont été réalisées par qPCR après les 20 jours d'exposition. Chez les témoins, les niveaux de transcrits des 3 gènes des *MTs* à 20 jours sont significativement plus faibles qu'à 12 jours de développement. Cela laisse supposer un rôle physiologique moins important des *MTs* chez les jeunes escargots de 20 jours que chez des embryons en fin d'organogenèse de 12 jours. L'expression du gène *CdMT* est augmentée significativement en fonction de la concentration de Cd testée alors que les transcrits des 2 autres gènes augmentent significativement à 4 et 6 mg/L. L'expression des gènes des *MTs* en exposition continue diffère donc des résultats préalablement obtenus en exposition de 24 heures au Cd où seule une réponse spécifique du gène *CdMT* avait été démontrée. Suite à l'exposition à la BB, le nombre de transcrits des 3 isogènes augmente significativement dès 2,5 g/L de BB (0,5 g/L de Cu). Cette surexpression généralisée des gènes des *MTs* pourrait être attribuée aux différents composés contenus dans la BB (sulfate et chaux) et/ou à des effets indirects du Cd et du Cu.

Mots clés : embryotoxicité, detoxication, cadmium, Bouillie Bordelaise, spécificité de réponse

III.3.3.1. Introduction

Metallothionein (MT) proteins have been well studied in the adults of terrestrial gastropods such as Helicidae snails. In several species, including the roman snail *Helix pomatia* and the garden snail *Cantareus aspersus* (syn. *Helix aspersa*), three MT isoforms have been identified. Two of these isoforms have metal-selective features and perform metal-specific tasks (Dallinger et al., 1997). The Cd-selective isoform is involved in the detoxification of cadmium from the digestive tissues (Chabicovsky et al., 2003), and the Cu-selective isoform is implicated in regulating copper associated with haemocyanin synthesis (Dallinger et al., 2005). The third isoform is a non-specific MT (CdCuMT) that is expressed constitutively at only low basal levels (Hispard et al., 2008; Höckner et al., 2011).

Recently, the presence of the three MT isogenes has been confirmed in both non-exposed and Cd-exposed *Cantareus aspersus* embryos after 6 days of development (Baurand et al., 2014b). The mRNA expression levels of the three MT gene has been studied in embryos following a 24-hour long exposure to Cd (5, 10 and 15 mg/L). The results revealed that only the *CdMT* gene was upregulated by Cd treatment in embryos exposed at the beginning of their embryogenesis (Baurand et al., 2014b) or later in their development (Baurand et al., 2014d); neither the *CuMT* nor *CdCuMT* gene was up-regulated by Cd treatment.

Continuous exposure to Cd (20 days) is known to exert toxic effects such as decreasing growth and heartbeat, increasing malformations and delaying the time of hatching (Baurand et al., 2014a). Embryogenotoxic effects have also been demonstrated by RAPD from concentrations of 2 mg Cd/L (Baurand et al., 2013). To date, there is no data available regarding the expression of *MT* genes after 20 days of continuous Cd exposure.

Bordeaux mixture is used as a fungicide in vineyards, fruit farms and gardens to prevent infestations of fungi such as downy or powdery mildew. Embryotoxic effects of this mixture, which is composed of Cu (20%), have been studied using a liquid phase bioassay (Druart et al., 2012). EC₅₀ value based on hatching success following 20 days of exposure to 8 mg/L of the mixture (1.60 g/L of Cu) was determined, and no signs of embryogenotoxicity were found by RAPD in embryos exposed to a range of concentrations from 2.5 to 10 g/L of the Bordeaux mixture (Baurand et al., 2014c). Cu is an essential metal that is required for creation of the respiratory pigment in the haemocyanin of snails. Its association with the Cu-selective MT isoform has been proven in adult snails (Dallinger, 2005). To date, however, no data are

available for embryos regarding the responses of the MT isoforms to Bordeaux mixture exposure.

The aim of this study was to examine the effect of Cd or Cu from a fungicide formulation on *MT* gene expression. *MT* transcripts were assessed in snail embryos exposed to Cd solutions or to a copper-based-fungicide (Bordeaux Mixture) for 20 days.

III.3.3.2. Materials and Methods

Chemicals and Cd analysis

The Cd solutions used during the exposure were the same as those used by Baurand et al. (2013). Nominal concentrations of Cd were 2, 4 and 6 mg Cd/L. Bordeaux mixture solutions were made from powdered commercially available Bordeaux Mixture RSR Disperss (20% Cu, Cerexagri, Cergy, France). The nominal exposure concentrations tested were 0.5 and 1.5 g/L of Cu (2.5 and 7.5 g/L of the Bordeaux mixture). The actual concentrations measured by ICP-AES (ICAP 6000 series model radial, Thermo scientific, France) were 2.2, 4.7 and 7.1 mg/L for the Cd and 0.37 and 1.19 g/L for the Cu.

Exposure system

Eggs were obtained from our standardised laboratory rearing and were exposed using the liquid phase bioassay as described previously (Baurand et al., 2013). Four freshly laid clutches were exposed to either demineralised water as a control or to increasing solutions of the contaminants (Cd or BM) throughout embryonic development (20 days).

Sample preparation for expression measurements of MTs gene

At the end of the exposure period (20 days), the embryos were extracted from the albumen as described in Baurand et al. (2014a). For each modality (control and Cd or BM exposed samples), pools of 3 embryos were prepared in an RNA stabilisation solution (RNAlater[®], Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and stored at -80°C. RNA isolation, reverse transcription and quantitative PCR measurements were performed as described previously by Baurand et al. (2014a, b).

Statistics

All statistical analyses were performed using the R software (2.13.2) (R Development Core Team, 2004, <http://www.R-project.org/>). The Kruskal-Wallis rank test was used to compare the qPCR results from the non-exposed samples at 20 days for each *MT* gene. Comparisons between the expression values at 20 days and the values found by Baurand et al. (2014a) at 6, 7 and 12 days for each of the 3 *MT* genes were made using the KW rank test.

The Mann-Whitney rank sum test was used to compare 2 by 2 levels of expression for each of the modalities in the Cd- or Cu-exposed groups. In all cases, statistical significance was defined as $p < 0.05$.

III.3.3.3. Results and discussion

Expression of MTs in unexposed 20 days-old embryos

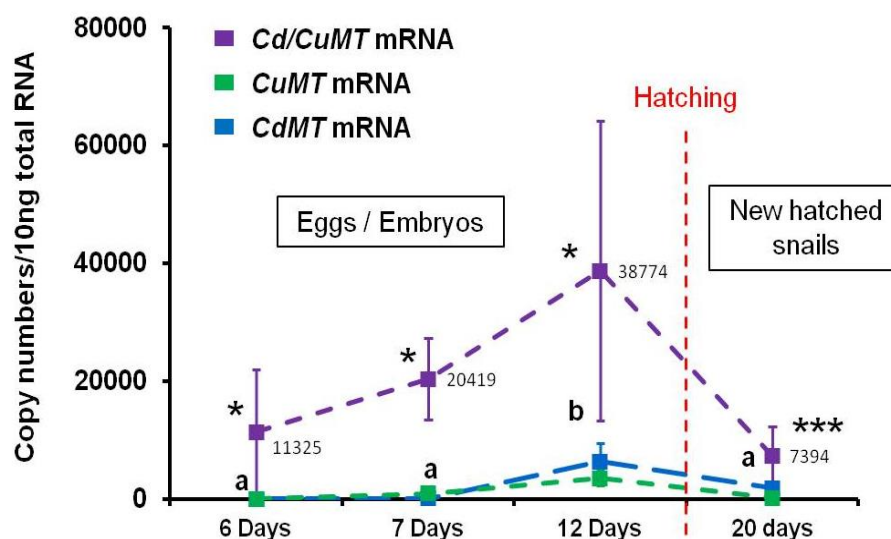


Figure III-25 : Transcription of mRNA *MTs* genes in 20-days-old unexposed embryos (present data) and comparisons with transcription levels at 6, 7 and 12 days (adapted from Baurand et al. 2014b).

Values are given in mRNA copy number / 10 ng of total RNA. For each point of measurement, mean values et SD are given ($4 < n < 6$). Differing lower case letters (a, b) indicate significant differences between single values for each of the three *MT* isoform genes at days 6, 7, 12 and 20 (Kruskal-Wallis test, $p < 0.02$). * and ***: Significant differences (Kruskal-Wallis test, $0.001 < p < 0.03$) between *CdCuMT*, *CdMT* and *CuMT* at each dates.

As shown in Figure III-25, the mRNA levels of *CdCuMT* in the non-exposed 20-day-old embryos are higher than the levels of *CuMT* (KW $\chi^2 = 10.6$, $df = 2$, $p = 0.005$) but not significantly different from the mRNA levels of the *CdMT* gene. Expression levels of the 3 *MT* genes at 20 days are significantly lower than the values known for 12-day-old unexposed embryos (KW test, $df = 3$, $p < 0.003$). The values at 20 days are not significantly different from the values found by Baurand et al. (2014b) at 6 and 7 days in the unexposed embryos. The basal level of the *CdCuMT* mRNA in freshly hatched snails (20 days) in our study (7,394 +/- 4,844) is near the mean mRNA level known for adult snails (5,027 +/- 2078; Höckner et al., 2011). The mRNA levels for the *CdMT* and *CuMT* genes in the 20-day-old embryos are lower than the known values for unexposed adults (44,973 +/- 27,488 and 11,287 +/- 4,688 for *Cd* and *CuMT*, respectively; Höckner et al., 2011). These results show that the mRNA levels of the mixed isogenes seem to reach the basal levels observed in adults rapidly after the hatching period, whereas the others two isogenes show very low levels of mRNA compared

to levels in adults. The kinetic of expression of the *CdCuMT* gene throughout embryonic development suggests that this isoform may have a more prominent role during embryonic development than in adults as already suggested by Baurand et al. (2014b).

Expression levels of the three *MT* isoform genes in cadmium-exposed embryos

In Cd-exposed embryos (Figure III-26A), a significant concentration-dependent induction of transcription levels is observed for the *CdMT* gene at each Cd concentration tested ($W = 0$, $p = 0.05$ for each concentrations of exposure). The two other genes, *CuMT* and *CdCuMT*, are over-expressed at the two highest tested concentrations, 4 and 6 mg/L ($W = 0$, $p = 0.049$). The pattern of MT gene induction in the present study is different from the pattern obtained with a slightly different exposure regime (24 hours) by Baurand et al. (2014a, b), where a Cd specific response was demonstrated for only the *CdMT* gene. The present results most likely show that a prolonged exposure to Cd (3 weeks) is able to induce an up-regulation of non-specific MT genes. The difference between the two regimes (continuous here *versus* 24 h in Baurand et al., 2014d) possibly causes differential Cd diffusion through the eggs.

In Cu-exposed embryos (Figure III-26B), the 3 isogenes are up-regulated at all of the Bordeaux mixture concentrations tested. The mRNA level of the *CuMT* gene is significantly higher at 2.5 and 7.5 g/L of Bordeaux mixture (0.5 and 1.5 g/L of Cu) compared with the control ($W = 6$, $p = 0.001$ and $W = 8$, $p = 0.001$ for the 2 concentrations, respectively) The same induction is found for the *CdMT* gene ($W = 0$, $p < 0.001$ for the 2 concentrations) and the *CdCuMT* gene ($W = 0$, $p < 0.02$ for the 2 concentrations). Unlike the *CdMT* gene induction in the Cd-exposed embryos, the over-expression of *MT* genes in the Bordeaux mixture-exposed embryos is not dose-dependent. The mRNA level of the *CuMT* gene is higher than levels measured following the two scenarios used for Cd exposure (continuous or 24 h). This is evidence that the *CuMT* gene is induced by the Cu from the Bordeaux mixture. The general up-regulation of the three *MT* genes can most likely be explained by the fact that the Bordeaux mixture is composed of copper sulfate (CuSO_4) and slaked lime (Ca(OH)_2). Perhaps the non-copper compounds or the other contaminants could also up-regulate the *CdMT* and *CdCuMT* genes. Recently, an analysis of recombinant MT protein structures from *C. aspersus* adults has shown that the mixed CdCuMT has a higher preference for Cu ions than Cd^{2+} ions (Pérez-Rafael et al., 2014). The overexpression of the mixed gene in embryos exposed to BM could be a result of this preference. However, studies examining the expression of *MT* isogenes after continuous exposures to Cu mono-element solutions are needed to validate this hypothesis.

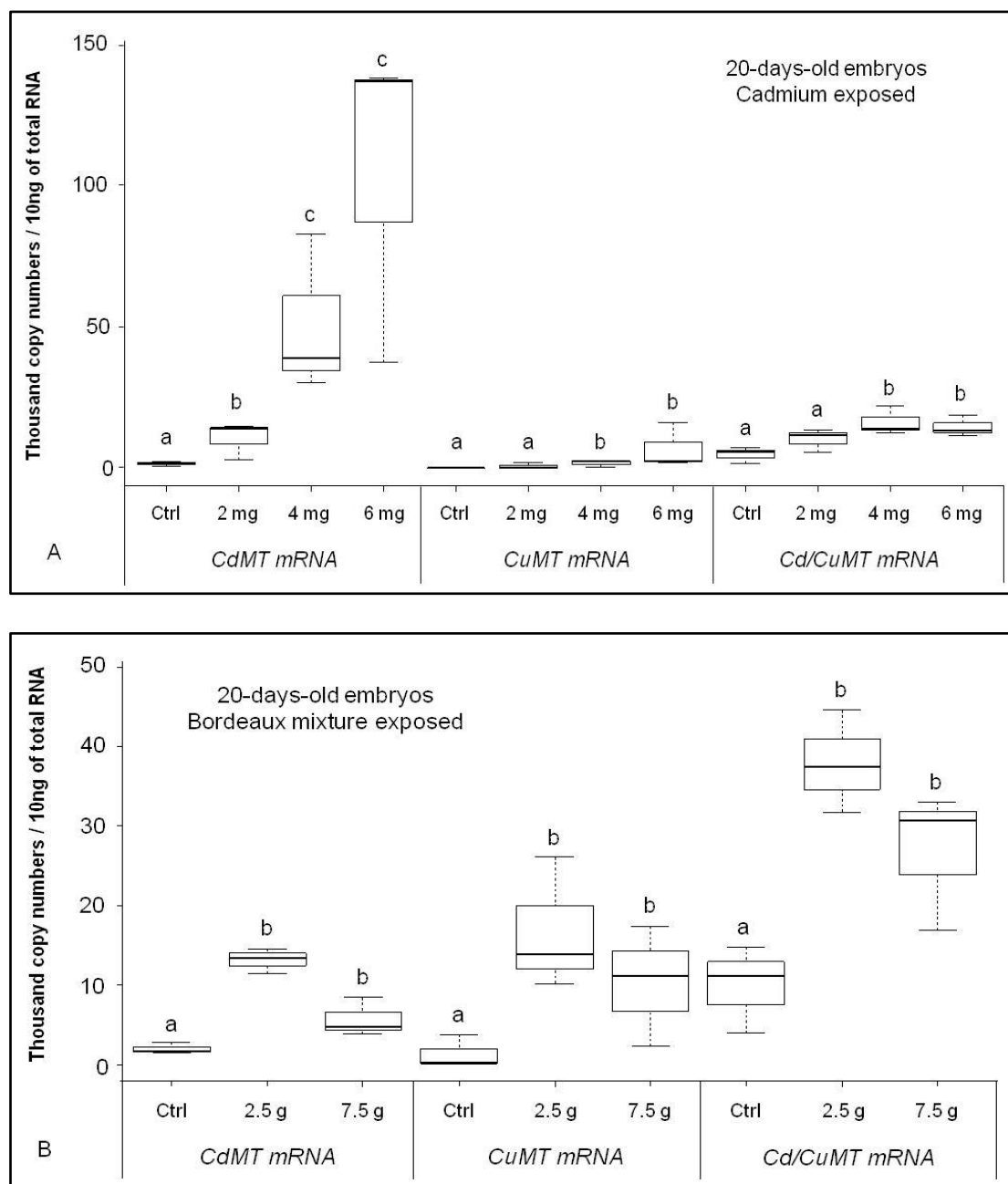


Figure III-26 : Transcription of mRNA MT genes in 20-days-old embryos Cd or Bordeaux Mixture-exposed.

Values are given in thousand mRNA copy number/10 ng of total RNA. A: Cd-exposed embryos, B: Bordeaux Mixture-exposed embryos. Box plots indicate the median values (bold line) for each group, the edges of the boxes are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. a, b, c: significant differences (Mann Whitney U test, $p < 0.02$) of *MT* expression exposed embryos ($n = 3$).

III.3.3.4. Conclusion

The results of this study are the first to report *MT* gene expression in 20-day-old embryos exposed to Cd or Bordeaux mixture solutions (20 % Cu) for 3 weeks. The data presented show that all three of the *MT* genes are overexpressed from exposure to 4 mg/L of Cd and to all the tested concentrations of Cu from the Bordeaux mixture. The strong induction of the

mixed *CdCuMT* gene after BM exposures suggests that this MT isoform may play a more important role in Cu detoxification than the CuMT.

The differences of MT expression pattern obtained between 24 hours exposure to Cd (inducing only *CdMT* gene overexpressed) and continuous regime (inducing general overexpression of all isogenes) evidenced the influence of modalities of exposure on *MT* gene induction. Our present work demonstrates the specificity of the *CdMT* gene to Cd exposure. However, it does not show any real specificity of the 2 others genes to Cu from the Bordeaux mixture.

III.3.3.5. Acknowledgements

Funded by the support of the Conseil Régional de Franche-Comté, the Ecole Doctorale Environnement-Santé and the Université de Franche-Comté, and by the Austrian Science Foundation (FWF project No. P 23635-B20 to R.D.).

III.3.3.6. References

- Baurand, P.-E., De Vaufleury A., Scheifler, R., Capelli, N., 2013. Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analysis and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47: 9505–9513.
- Baurand, P.-E., Capelli, N., Scheifler, R., De Vaufleury, A., 2014a. An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization. *Submitted*.
- Baurand, P.-E., Pedrini-Martha, V., De Vaufleury, A., Niederwanger, M., Capelli, N., Scheifler R., Dallinger, R. 2014b. Differential expression of metallothionein isoforms in snail embryos reflects early life stage adaptation to metal stress. *Submitted*.
- Baurand, P.-E., Capelli, N., De Vaufleury, A., 2014c. Assessment of genotoxicity of various compounds on terrestrial snail embryos with Random Amplified Polymorphic DNA. *In prep*.
- Baurand, P.-E., Dallinger, R., Niederwanger, M., Capelli, N., Pedrini-Martha, V., De Vaufleury, A., 2014d. Differential sensitivity of snail's embryos to Cd: relation with age and MT genes expression. *In prep*.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P.E., Kägi, J.H.R., 1997. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature (London)* 388(6639), 237-238.
- Dallinger, R., 2005. Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R1185–R1195.
- Filipič, M., 2012. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 733, 69–77.
- Hispard, F., Schuler, D., De Vaufleury, A., Scheifler, R., Badot, P.-M., Dallinger, R., 2008. Metal distribution and Metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropods, Pulmonata) *Environ. Toxicol. Chem.* 27(7), 1533–1542.
- Höckner, M., Stefanon, K., De Vaufleury, A., Monteiro, F., Pérez-Rafael, S., Palacios, Ò, Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Physiological relevance and contribution to metal balance of specific and non-specific metallothionein isoforms in the garden snail, *Cantareus aspersus*. *Biomaterials* 24, 1079–1092.
- Pérez-Rafael, S., Monteiro, F., Dallinger, R., Atrian, S., Palacios, Ò, Capdevila, M., 2014. *Cantareus aspersus* metallothionein metal binding abilities: The unspecific CaCd/CuMT isoform provides hints about the metal preference determinants in metallothioneins. *BBA-Proteins Proteom.*

III.3.4. Résumé du chapitre 3

- Les embryons semblent exprimer les gènes de *MTs* de façon constitutive.
- L'expression des 3 gènes en condition normale augmente au 12^{ème} jour de développement laissant supposer un lien avec la différenciation et le développement des tissus/organes.
- Le taux d'expression de l'isogène mixte est supérieur à celui des 2 autres gènes chez les embryons non exposé alors que chez les adultes la situation est inverse. Ceci lance le débat quant à un possible rôle de ce gène mixte lors de l'embryogenèse.
- Les embryons exposés au Cd durant 24 h sont capables de surexprimer le gène spécifique du Cd : 1/ dès 6 jours de développement lorsqu'ils sont exposés au début de l'embryogenèse 2/ dès la fin de l'exposition (jour 7) pour les embryons exposés au jour 6.
- Les embryons de 12 jours exposés au Cd tardivement au cours de l'embryogenèse sont capables de surexprimer le gène *CdMT* à la plus forte concentration d'exposition à l'inverse des embryons exposés en début de développement.
- En exposition continue au Cd ou à la Bouillie Bordelaise, les 3 isogènes sont surexprimés.

PARTIE IV. Discussion Générale et Perspectives

IV.1. Discussion générale

La présente thèse a permis d'étudier les réponses embryotoxiques, génotoxiques et l'expression de gènes d'un système de détoxification impliquant les metallothionéines chez les stades embryonnaires de l'escargot terrestre *Helix aspersa* (Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*). Dans cette discussion, l'accent sera porté sur la complémentarité des approches utilisés au cours de nos travaux pour l'étude de l'embryotoxicité de contaminants métalliques (Cd, Cu) et organiques (pesticides) lors du développement embryonnaire de l'escargot à divers niveaux d'organisation biologique.

Les effets toxiques ont été évalués au niveau individuel grâce au suivi de divers paramètres morphologiques et physiologiques au cours du développement embryonnaire. Cette approche sera discutée en première partie.

La toxicité a également été analysée au niveau infra-individuel via la détection de la fragmentation de l'ADN (*DNA laddering*) du génome des embryons et de signes de génotoxicité par RAPD. Les atouts et les limites de ces approches moléculaires feront l'objet de la seconde partie de la discussion.

Les réponses apportées par cette thèse sur les liens entre contamination des oeufs, capacité de détoxification des embryons seront ensuite discutés en lien avec la toxicité observée au niveau individuel.

Enfin, quelques facteurs modulant les réponses des embryons aux substances chimiques feront l'objet de la dernière partie de cette discussion.

IV.1.1. Effets des substances chimiques au niveau individuel : caractérisation de l'embryotoxicité

Les travaux menés au cours de cette thèse confirment l'intérêt du LPB pour caractériser la toxicité de substances chimiques sur les 1^{ers} stades du développement d'*H. aspersa* (Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*). Les résultats obtenus grâce aux observations des critères morphologiques et physiologiques au cours du développement embryonnaire fournissent de nouveaux paramètres de mesure des effets toxiques (applicable à diverses étapes de l'embryogenèse) et permettent de déterminer leurs cinétiques d'apparition.

Durant des expositions continues au Cd et au Cu (Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot

Helix aspersa), le suivi des paramètres de développement ne permet pas la mise en évidence des signes de toxicité durant la première semaine de l'embryogenèse. On peut penser que la coque, composée de Ca^{2+} , entourant l'albumen de l'œuf joue un rôle de barrière ; elle limite la diffusion des métaux jusqu'à l'embryon durant la première semaine d'embryogenèse même si du Cd peut être retrouvé dans l'albumen après 7 jours d'exposition (Druart et al., 2010). Strmac et al. (2002) suggèrent que le chorion des pontes de poisson zèbre ralentit le transfert des métaux jusqu'à l'embryon. Cependant dans nos travaux, les concentrations en Cd ayant été mesurées dans les œufs d'escargot entiers (coque + albumen + embryon), il est difficile de statuer sur la proportion de Cd contenue dans chacune des parties de l'œuf.

La mesure du rythme cardiaque au 7^{ème} jour d'exposition est le 1^{er} paramètre suivi qui permet de rendre compte d'un effet toxique au niveau physiologique. Il est largement utilisé lors d'étude d'embryotoxicité chez de nombreuses espèces aquatiques (poisson zèbre, Hallare et al., 2005 ; escargot *Marisa cornuarietis*, Schirling et al., 2006). La modification du rythme cardiaque peut-être le résultat d'une compétition du Cd avec les voies calcium-dépendantes qui sont essentielles pour un fonctionnement normal du système cardiaque chez les mollusques (Lui et al., 2013). Cependant peu d'information sont disponibles concernant les mécanismes précis impliqués dans ce type de dysfonctionnement cardiovasculaire.

Les suivis de la taille des embryons en seconde partie de développement embryonnaire (jour 10) et du poids frais des jeunes éclos se sont révélés être intéressants lors de la recherche des effets néfastes des contaminants métalliques sur la croissance embryonnaire. Les résultats obtenus sur la diminution de la croissance à 10 jours sont corrélés à la diminution du poids des jeunes éclos dans le cas du Cd. Pour ce qui est du Cu, les embryons exposés en continu à 0,5 g/L (soit 2,5 g/L de BB) ont un poids à l'éclosion plus faible que le groupe témoin ou encore que les jeunes éclos exposés à 6 mg/L de Cd (cf III.1. Chapitre 1). Cependant, ces données ont été obtenues sur de faibles effectifs et nécessitent d'être confirmées. La diminution de la taille et de la masse des embryons exposés pourrait résulter du coût énergétique que représente la détoxification des métaux, et notamment la synthèse de MTs. Les hauts niveaux d'expression des gènes des MTs observés à 20 jours chez les embryons exposés au Cd et au Cu (Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*) suggèrent également que la balance énergétique pourrait être déplacée vers la détoxification, ce qui limiterait l'énergie allouée pour la croissance. Notons, néanmoins, que le coup énergétique pour la synthèse des MTs est encore mal connu (Kammenga et Laskowski, 2000).

Le suivi des retards d'éclosion chez *H. aspersa* apporte des informations supplémentaires sur la perturbation du processus de développement et/ou de l'éclosion comme cela a déjà été évoqué chez *Danio rerio* ou *M. cornuarietis* (Hallare et al., 2005 ; Schirling et al., 2006).

Les résultats complémentaires du Chapitre 1, montrent qu'un faible nombre de paramètres de mesure d'effets toxiques suivis au cours du développement embryonnaire sont significativement modifiés lors d'expositions à 40 µg/L, 4 mg/L de Cd comparativement aux données obtenues à 6 mg/L de Cd. Ces données sur le Cd ont permis de démontrer l'existence d'un seuil de toxicité entre 4 et 6 mg/L.

La mesure de toxicité via des paramètres morphologiques et physiologiques est cependant très laborieuse car elle nécessite de retirer la coque calcaire des œufs sans endommager l'albumen et l'embryon afin de pouvoir réaliser des contrôles visuels sous la loupe binoculaire ou le microscope (Figure IV-1). Un mois et demi de mesure quasi journalière ont été nécessaires pour récolter les données brutes et cela pour une seule concentration de Cd sur une dizaine de pontes différentes. Même si les paramètres suivis sont très simples, le nombre de mesures nécessaires pour obtenir des effectifs suffisants, afin de réaliser des statistiques robustes, rendent ce type d'étude très chronophage et lourde à mettre en œuvre. Ces critères semblent plus faciles à suivre chez des organismes aquatiques (comme *Lymnaea* ou *Marisa*) où aucune manipulation préalable n'est nécessaire avant les observations macroscopiques des effets toxiques des substances chimiques (Cd, Schirling et al., 2006 ; Cu, Das et Khangarot, 2011 ; solvants, Bandow et Weltje, 2012 ; produits de traitement de surface, Mazur et al., 2013).

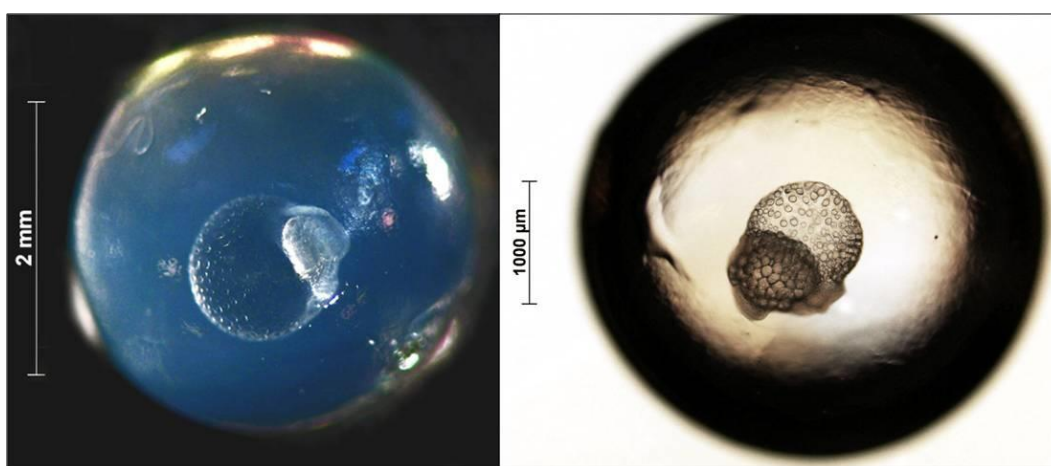


Figure IV-1 : Œufs d'*Helix aspersa* sans coque calcaire. Observations entre 6 et 7 jours au stade larvaire sous loupe binoculaire (à gauche) et sous microscope (à droite).

IV.1.2. Effets des substances chimiques au niveau génomique

Une grande partie des travaux de cette thèse s'est intéressée à l'étude des signes d'embryogénotoxicité via la méthode RAPD couplée à un système d'électrophorèse haute résolution. Avant l'étape d'amplification par PCR, une vérification par électrophorèse de la qualité des ADNs extraits est requise. Cette vérification permet aussi la détection des signes éventuels de fragmentation de l'ADN génomique.

IV.1.2.1. Fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN (*DNA laddering*) est un des signes de mort cellulaire programmée connus chez de nombreux organismes (Reape et McCabe, 2008 ; Lord et Gunawardena, 2012). Elle apparaît après migration électrophorétique de l'ADN génomique sous forme de fragments de faible masse moléculaire (< 1 kpb) formant une structure en barreaux d'échelles. Des signes de fragmentation de l'ADN génomique ont déjà été révélés lors de stress de forte intensité, par exemple chez des poissons issus de sites poly-contaminés par des concentrations très élevées en ETMs (Omar et al., 2012 ; Ben Salem et al., 2014).

Dans notre étude, la fragmentation n'est détectée qu'après des expositions continues (20 jours) à des concentrations très élevées de 2 des 4 contaminants étudiés : 6 mg/L de Cd et à partir de 0,10 mg/L de tébuconazole (Figure IV-2, Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*). Nos travaux montrent que la technique du *DNA laddering* est peu sensible et inappropriée pour la recherche d'effet précoce de toxicité (du moins pour le Cd et les 2 pesticides étudiés).

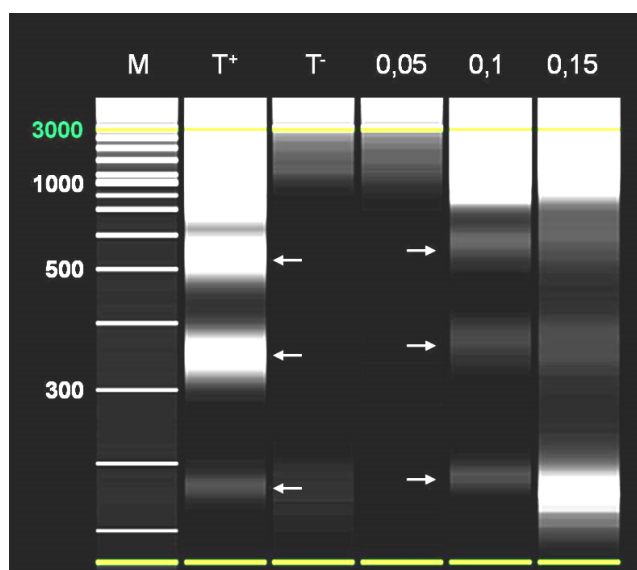


Figure IV-2 : Détection de la fragmentation d'ADN chez les embryons d'escargots exposés 20 jours au fongicide Corail®

M : marqueur de taille en pb, T⁺ : témoin positif 6 mg/L de Cd, T⁻ : témoin négatif non exposé, 0,05 à 0,15 : échantillons exposés respectivement à 0,05 ; 0,10 et 0,15 mg/L de tébuconazole de la formulation commerciale du Corail®. Les flèches blanches montrent les fragments d'ADN de taille inférieure à 700 pb

Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*

Exposition		Continue			(20 jours)		24 heures			
Contaminants		Bouillie Bordelaise (Cu)	Corail ® (tebuconazole)	Round UP ® (glyphosate)	Cadmium	Cadmium - Expo 0 jour		Cadmium - Expo 6 jours		
Concentrations	[Exposition]	1 - 1,5 - 2 g/L	0,05 - 0,1 - 0,15 mg/L	15, 30, 50, 70 mg/L	2, 4, 6 mg/L	5, 10, 15 mg/L				
	[Cd œufs] µg/gMS				4 mg/L, J3 à J20 10 à 20 µg 6 mg/L, J3 à J20 23 à 27 µg	5 mg/L J1 à J15 12 à 14 µg	10 mg/L J1 à J15 23 µg	15 mg/L J1 à J15 35 à 37 µg	5 mg/L J7 à J15 10 à 12 µg 10 mg/L J7 à J15 21 à 23 µg 15 mg/L J7 à J15 36 à 45 µg	
	EC50 éclosion	1,99 mg/L (IC95%:1,89 - 2,09)	0,087 mg/L (IC95%:0,079 - 0,1)	29,02 mg/L (IC95%:21,3 - 41,3)	3,47 mg/L (IC95%: 2,914,51)	5,05 mg/L (IC95%:4,41 - 5,69)		9,48 mg/L (IC95%:7,84 - 11,23)		
	Cœur	■ 0,5 g/L			→ 4 et 6 mg J7					
	Taille	■ 0,5 g/L			→ 6 mg J10					
Embryotoxicité et mesures morphologiques / physiologiques	Masse éclos	→ 0,5 g/L			→ 6 mg/L					
	Délais éclos	■ 0,5 g/L			4 jrs 6 mg/L					
	Fragmentation ADN	Non	0,1 et 0,15 mg/L 20 jrs	Non	6 mg/L - 20 jrs	Non		Non		
	Dommages à l'ADN	RAPD	0	++	+++	+	0		0	
		Effet dose	Non	Non	Oui	Non	Non		Non	
Détoxication gènes MTs	CdMT	→			→	→		→		
	CuMT	→			→	-		-		
	CdCuMT	→			→	-		-		

IV.1.2.2. Détection du potentiel génotoxique des substances chimiques par RAPD

Nos travaux ont mis en évidence des effets génotoxiques variables suivant le contaminant étudié ($\text{Ru}^{\text{®}} > \text{Corail}^{\text{®}} > \text{Cd}$; Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*), chez des embryons exposés pendant 20 jours. Un effet-dose a été démontré pour le $\text{Ru}^{\text{®}}$ avec une augmentation du nombre de changements dans les profils d'amplifications RAPD liée à l'augmentation de la concentration d'exposition. Pour 2 autres contaminants testés, (Cd et le $\text{Corail}^{\text{®}}$) aucun effet dose sur les effets génotoxiques détectés n'a été mis en évidence. Enfin, aucun effet embryogénotoxique n'a été montré après exposition au Cu via la BB. Pour les pesticides étudiés, les effets embryogénotoxiques sont détectés chez des embryons exposés à des concentrations bien inférieures aux doses recommandées pour des applications sur la vigne. Elles correspondent à des dilutions de solution commerciale comprises entre 4 500 et 14 000 fois pour le $\text{Corail}^{\text{®}}$ et à des dilutions de 70 et 340 fois pour le $\text{Ru}^{\text{®}}$, soit dans une gamme de concentration réaliste d'un point de vue environnemental.

La RAPD a permis de montrer des altérations du génome d'embryons d'escargot exposés à des concentrations inférieures à la EC_{15} pour les contaminants étudiés. Pour ces concentrations, aucun signe de fragmentation de l'ADN n'est détecté et aucun paramètre de mesure de la toxicité aux niveaux morphologique et physiologique au cours du développement n'est impacté. La technique RAPD pourrait permettre d'obtenir des mesures très sensibles d'effets toxiques révélant l'exposition aux faibles concentrations. Cette approche est plus sensible que les mesures classiques de toxicité (malformations, survie, mortalité, taux d'éclosion), bien que les informations sur le type exact de mutations et leur quantification soit impossible.

Les données obtenues par RAPD en exposition continue confirment les propriétés génotoxiques du Cd déjà observées chez les stades embryonnaires d'autres organismes (Schirling et al., 2006 ; Fourie et al., 2007 ; Morin et al., 2011 ; Mai et al., 2012 ; cf. I.6.1.4. Effets du Cd chez les embryons). Elles démontrent aussi pour la 1^{ère} fois les effets embryogénotoxiques de 2 solutions commerciales de pesticides chez *Helix aspersa*.

IV.1.2.3. Apports et limites de la RAPD-SHR lors de la mesure de la génotoxicité

La mise au point de la méthode RAPD sur le modèle d'étude embryon d'escargot (cf III.2. Chapitre 2) et son couplage avec un système d'électrophorèse haute résolution (SHR) facilitent la phase d'analyse post-PCR grâce à l'amélioration de la qualité des images générées et à l'automatisation de la lecture des profils. Ces 2 atouts permettent de diminuer la subjectivité existante lors de la phase d'analyse des profils en présence/absence de fragments, dite analyse binaire, classiquement utilisée (analyse visuelle ou par l'utilisation d'un logiciel de traitement d'image). Les principaux intérêts de cette approche et les limites concernant une approche quantitative de la génotoxicité sont abordés ci-dessous.

Analyse binaire des profils

Les profils d'amplification ont été analysés au cours de nos travaux de manière binaire c'est-à-dire en gain/pertes de fragment constituant les profils. Ce type d'analyse permet la détection de signes d'altération dans le génome, mais pas d'identifier précisément le type de mutations, ni de la quantifier. Malgré cela, l'analyse binaire des profils d'amplification RAPD est majoritairement utilisée (Zhiyi et Haowen, 2004 ; Enan, 2006 ; Cenkci et al., 2009 ; Mohanty et al., 2009 ; Ahmad et al., 2012 ; Aydin et al., 2012 ; Lee et al., 2013). Une fois mis au point, le couplage RAPD-SHR rend possible l'analyse haut-débit d'un grand nombre d'échantillons exposés à divers contaminants (ETMs, herbicides, fongicides par exemple) dans un temps relativement court. Pour l'analyse de 96 extraits d'ADN, il faut une journée jusqu'à l'obtention des résultats d'analyses de profils (temps de PCR compris). Ce dispositif est donc très adapté à une première approche visant le criblage de la génotoxicité de diverses substances ou matrices (boues, lixiviats, sols contaminés) chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*. Autre atout, il pourrait être adapté à n'importe quel modèle d'étude car la RAPD repose sur des amplifications non ciblées sur un génome spécifique à l'aide d'amorces aléatoires.

Analyse semi-quantitative des profils

Pour compléter l'analyse qualitative de la génotoxicité, un 2^{ème} type d'approche, beaucoup moins utilisé que l'analyse binaire, s'intéresse à l'intensité des fragments constituant les profils RAPD (De Wolf et al., 2004 ; Atienzar et al. 2004 ; Atienzar et Jha, 2006 ; Hagger et al., 2005 ; Liu et al., 2009; Zhou et al., 2011). Toutefois, la médiocre qualité des photographies issues des séparations électrophorétiques, elles-mêmes souvent liée à la mauvaise qualité des migrations (Hana et al., 2008 ; Gupta and Sarin, 2009 ; El-Maarouf-

Bouteau et al., 2011), explique certainement le peu d'utilisation de ce mode d'analyse des profils.

La méthode RAPD présente une grande sensibilité (Atienzar et Jha, 2006). Cependant, cet avantage la rend dépendante de nombreux facteurs qui peuvent avoir une incidence sur le nombre et l'intensité des fragments obtenus après l'étape d'amplification (par exemple, les concentrations en enzyme, en $MgCl^{2+}$, en dNTPs, en amorces, contaminations...). Même si nous avons pu limiter les variations de certains de ces paramètres par l'utilisation du kit PuRe Taq Ready-To-Go PCR de GE Healthcare Biosciences (billes lyophilisées prédosées en enzyme, BSA, dNTPs et $MgCl^{2+}$), d'autres facteurs de variations comme la faible température d'hybridation utilisée lors des PCR (36°C) ont pu influencer la qualité des profils générés. Lors de nos travaux, l'eau UP utilisée lors des amplifications s'est révélée avoir une influence non négligeable sur les profils obtenus. Elle sert notamment à diluer les solutions mères d'amorces et à ajuster le volume final de réaction à 25 µL dans tous les échantillons amplifiés. Enfin, elle est utilisée lors des dilutions des extraits parfois trop concentrés en ADN (> 40 ng / µL). Des problèmes d'amplifications parasites dans les témoins négatifs (dépourvus d'ADN, Figure IV-3) comme dans les échantillons analysés sont apparus après certaines étapes de PCR. Ces contaminations parfois répétées provenaient de l'utilisation d'eau UP contaminée. De tels problèmes ont été rapportés par Atienzar et Jha (2006), qui, même après traitement aux UVs et stérilisation de l'eau, n'ont pu éliminer ces amplicons parasites. Ces problèmes sont toutefois vite détectés à l'aide du HRS par l'apparition de profils flous sur les images et par une augmentation du nombre de pics amplifiés sur les électrophorégrammes correspondants (Figure IV-4). La plupart du temps, ces contaminations faussent la lecture automatisée des profils. Pour Zhiyi et Haowen (2004), une analyse robuste en RAPD repose sur la bonne qualité et l'intégrité des extraits d'ADN. Après les nombreuses RAPD réalisées au cours de ce travail, il apparaît, en effet, que la pureté de l'ADN est primordiale afin d'obtenir des profils d'amplifications clairs.

Comme nous avons pu le voir lors de l'étape de sélection des amorces, la variation d'intensité d'un même fragment au sein des 5 échantillons d'ADN témoins utilisés (issus de 5 pontes différentes) est parfois très importante (Figure IV-5). On peut regretter que ces variations inter-échantillons lors des études RAPD avec analyse de profils en terme d'intensité de fragments soient parfois passées sous silence. Ainsi, l'analyse de profils est toujours effectuée en comparaison d'un seul échantillon témoin sans prise en compte des variations « naturelles » d'intensité existantes entre plusieurs amplicons d'échantillons de même nature (cf. Hagger et al., 2005 ; Liu et al., 2007, 2009 ; Rocco et al., 2010, 2011, 2012).

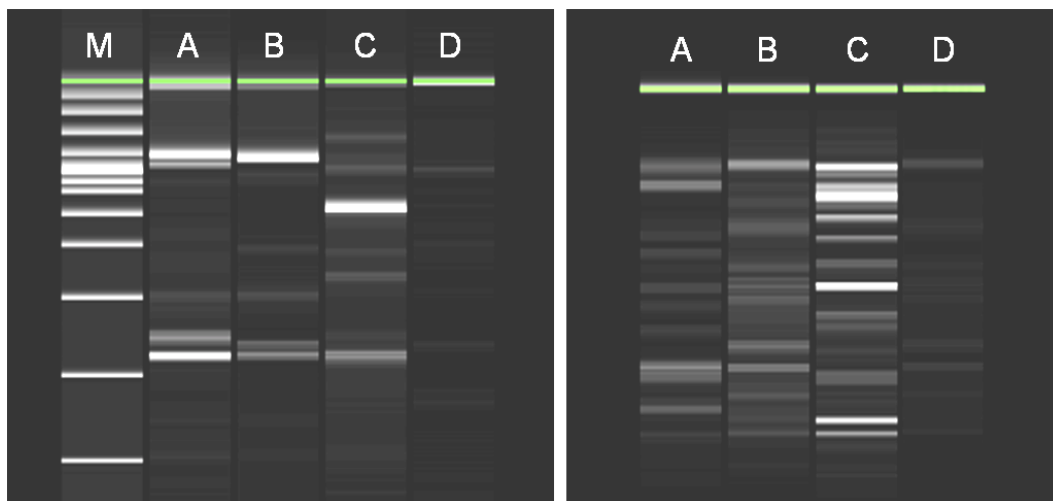


Figure IV-3 : Exemple d'amplifications parasites dans les témoins négatifs (sans ADN) pour l'amorce OPG17 (gel de gauche) et X19 (gel de droite) en fonction de l'eau utilisée.

M : marqueur de taille en pb. A, B, C, D : amplifications réalisées avec 4 eaux différentes, 2 eaux UP, une eau osmosée, une eau RNase free du kit PCR Qiagen®.

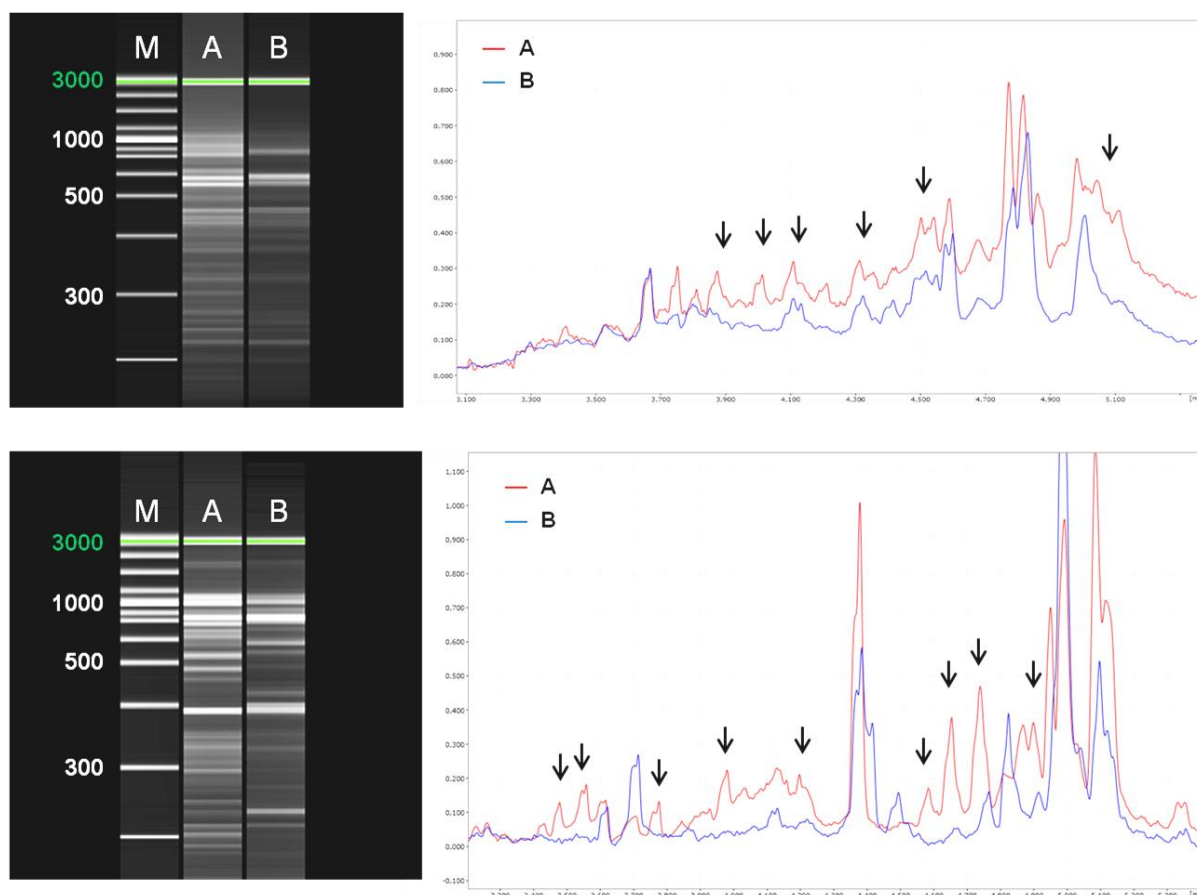


Figure IV-4 : Exemple de profils contaminés avec apparitions de nombreuses bandes amplifiées M : marqueur de taille en pb. A et B : respectivement profils contaminé (rouge) et non contaminé (bleu). Les flèches noires sur les électrophérogrammes indiquent les pics parasites.

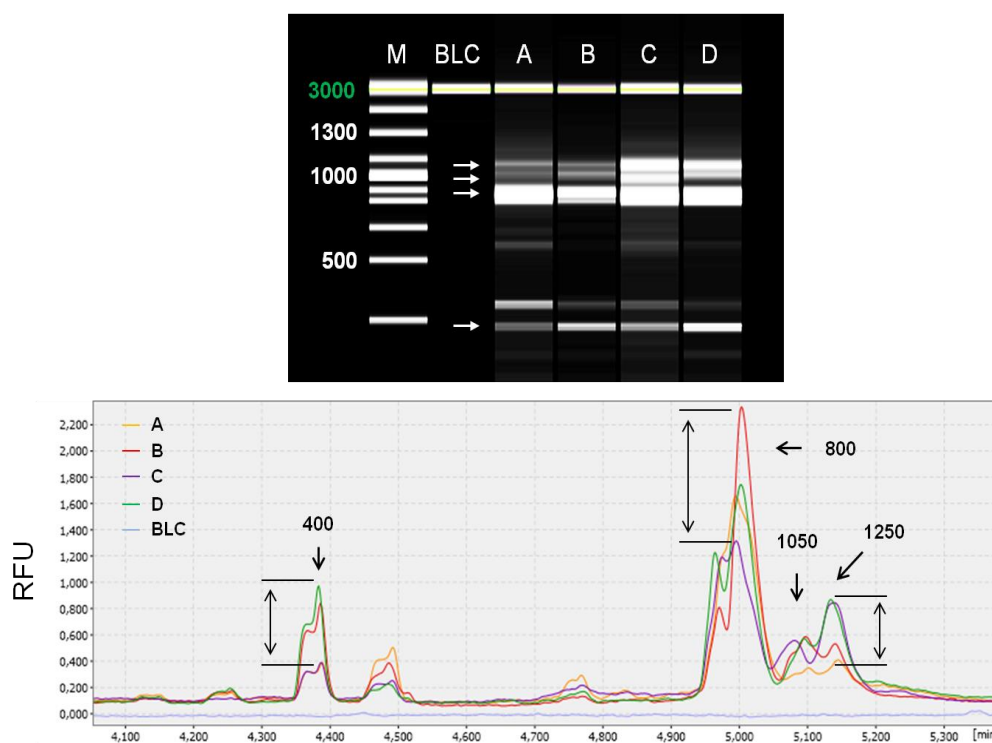


Figure IV-5 : Image de migration et électrophérogramme des profils témoins amplifiés avec l'amorce Saad02.

BLC : échantillon témoin négatif (sans ADN). A à D : 4 échantillons témoins. M : Marqueur de taille 100 pb à 2,5 kpb. Les doubles flèches noires montrent les variations d'intensité existantes entre les 4 échantillons témoins (= 4 pools différents d'œufs provenant de 4 pontes différentes) pour un même fragment amplifié.

Dans nos travaux, les variations d'intensité peuvent s'expliquer par des différences de pureté des extraits d'ADN, elles-même reflétées par des variations des rapports d'absorbances 260/280 nm. Il faut ajouter à cela le fait que les rendements d'extractions d'ADN sont très variables d'un échantillon à l'autre. Certains ont du être dilués plus que d'autres afin d'obtenir des volumes d'ADN à prélever compris entre 1 et 4 μL (pour 40 ng d'ADN total). L'ajout d'eau UP pour la dilution des ADN peut également augmenter les impuretés dans les échantillons et avoir des répercussions sur la qualité des profils obtenus. Ainsi, un échantillon d'ADN moins pur et très dilué aura plus de chance de présenter un profil flou, en cas de contamination de l'eau UP, qu'un échantillon d'ADN avec un bon rapport 260/280 nm (1,85 et 1,95) et peu ou pas dilué. Une analyse semi-quantitative robuste des profils RAPD basée sur l'intensité des amplicons ne peut être conduite, dans l'idéal, que sur des échantillons d'ADN de même qualité avec des concentrations proches afin de limiter les variations de volume d'eau à ajouter entre les différents échantillons. Cependant les rendements d'ADN obtenus lors d'une même série d'extraction sont le plus souvent très variables (concentrations de 20 à 150 ng/ μL et rapport 260/280 nm de 1,6 à 1,95) notamment à cause de l'hétérogénéité des colonnes d'extraction des kits utilisés.

Ainsi, l'analyse semi-qualitative de la génotoxicité avec la RAPD-SHR pourrait être envisagée si toutes les conditions citées précédemment étaient réunies (absence d'impuretés dans les extractants, même qualité et même concentration des ADN). Dans ces conditions, rarement atteintes, ce système permettrait d'obtenir des résultats d'ordre semi-quantitatifs en plus des résultats obtenus en présence/absence de fragments.

IV.1.3. Effets de contaminants métalliques : expression des gènes des métallothionéines chez l'embryon

Les métaux comme le Cd sont connus pour moduler l'activité transcriptionnelle de nombreux gènes et plus particulièrement ceux des métallothionéines (MTs). Dans les écosystèmes terrestres, ces dernières sont largement étudiées chez les macroinvertébrés du sols (nématodes, annélide, collemboles...) (Brulle et al., 2010) ou encore les mollusques gastéropodes (Dallinger, 1996 ; Höckner et al., 2011). Les travaux sur les MTs concernent les stades adultes mais aucune donnée n'était disponible chez les stades embryonnaires de mollusques gastéropodes terrestres. Dans ce contexte, l'étude de ces systèmes de défense a permis d'obtenir les premières données sur 1/ l'expression basale des gènes chez des embryons non-exposés et 2/ l'expression des isogènes des MTs chez des stades embryonnaires d'un invertébré terrestre suite à des expositions au Cd.

IV.1.3.1. Expression basale des gènes des métallothionéines

Cette thèse a permis d'obtenir les premières données d'expressions des gènes des MTs au cours de l'embryogenèse d'*Helix aspersa*. La détection des gènes *CdMT* et *CdCuMT* dès le 1^{er} jour de développement laisse supposer une expression constitutive chez les embryons non exposés (cf III.1.1). De tels résultats ont été rapportés chez l'embryon d'oursin *P. lividus*, où 2 des 5 gènes de MTs connus ont une expression constitutive (Ragusa et al., 2012).

Chez les embryons d'*H. aspersa* non soumis à un stress chimique, les résultats les plus inattendus proviennent de la hausse des niveaux de transcrits des 3 isogènes à 12 jours de développement et du taux d'expression de la *CdCuMT* plus élevé par rapport aux 2 autres isogènes. Cette modulation de l'expression des gènes des MTs au cours du développement suggère un rôle important de ces protéines lors de l'embryogenèse d'oeufs non exposés. En effet, les MTs sont connues pour avoir une fonction dans la différenciation et le développement des tissus et organes chez les stades embryonnaires notamment chez la truite *Salmo gairdneri* (Olsson et al., 1990). Une fonction des MTs dans la mise en place du système nerveux central des embryons d'amphibiens *Xenopus laevis* a été suspectée (Durliat

et al., 1999) comme chez le lézard *Podarcis sicula* (Simoniello et al., 2011). Concernant l'escargot petit-gris, après 10 jours de développement dans des conditions normales, l'embryon subit des changements importants : ses organes se différencient laissant apparaître les parties du corps comme la tête, les tentacules, le pied, les viscères, la coquille... (Druart et al., 2010). On peut donc suspecter une intervention des MTs au cours de la réorganisation des tissus lors du développement embryonnaire.

Le fort taux d'expression de la *CdCuMT* (cf III.3. Chapitre 3 et Tableau IV-2) chez *H. aspersa* par rapport aux 2 autres isogènes lors de la période embryonnaire est également surprenant et relance le débat sur son possible rôle durant l'embryogenèse de l'escargot. En effet, on peut penser que cette isoforme a une utilité lors de cette phase clé du développement puis qu'elle s'éteindrait durant la phase adulte. Les résultats obtenus après 20 jours de développement lorsque les embryons sont éclos (entre 4800 et 10 000 copies/10 ng d'ARN total, Tableau IV-2) soutiennent cette hypothèse avec une chute des niveaux d'expression du gène mixte pour atteindre des niveaux très proches de ceux mesurés chez l'adulte par Höckner et al. (2011) (Figure IV-6).

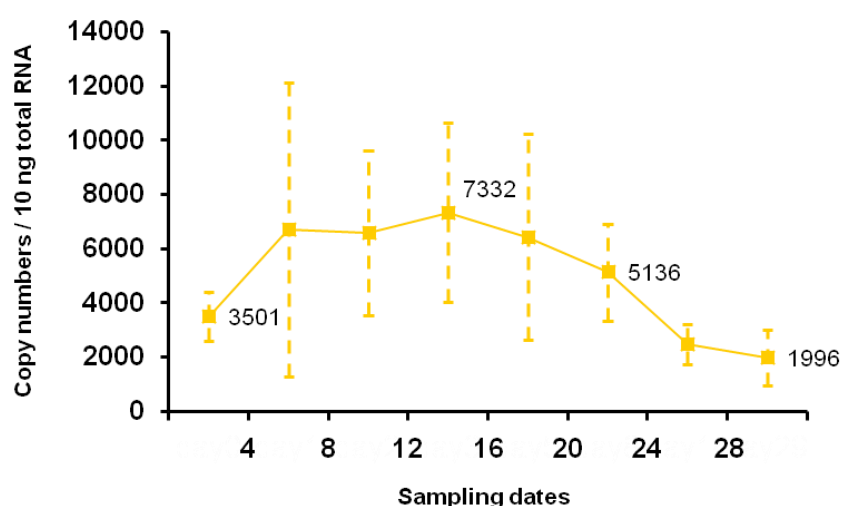


Figure IV-6 : Expression du gène de la *CdCuMT* chez les adultes témoins d'*Helix aspersa*.

(Adaptée d'après Höckner et al. 2011)

IV.1.3.2. Implications des gènes de métallothionéines dans la réponse au cadmium chez les embryons

Les résultats sur l'expression des gènes des *MTs* (cf III.3. Chapitre 3, Tableau IV-2) montrent que le Cd et le Cu peuvent avoir des effets au niveau moléculaire sur des gènes codant les systèmes de détoxification chez les stades embryonnaires de l'escargot. En régime d'exposition courte (24 heures), les embryons ont la faculté de répondre spécifiquement à un stress engendré par une exposition au Cd en surexprimant uniquement le gène *CdMT*. L'étude de la cinétique d'expression des gènes a démontré que l'induction du gène *CdMT* suite à une exposition au Cd peut être très rapide comme le montrent les résultats au jour 7 (soit juste à la fin de la période d'exposition 24h pour les exposés un jour 6). La diminution du taux d'expression du gène *CdMT* à 12 jours chez les embryons exposés précocement à 15 mg/L laisse supposer l'existence de capacités maximales de défense et pourrait être responsable de la toxicité évaluée via le succès d'éclosion en fin d'expérimentation (3,3 % à 15 mg/L ; cf III.3.2 et Figure III-24A).

En exposition continue au Cd (Tableau IV-2), l'induction des gènes de *MTs* est généralisée avec un effet dose-réponse pour le gène *CdMT* et une surexpression à partir de 4mg/L pour les 2 autres isogènes. Après exposition au Cu, une surexpression généralisée des gènes de *MTs* est également observée dès la première concentration étudiée (0,5 g/L).

Le premier fait inattendu vient de la surexpression du gène *CdMT* lors d'exposition en continu au Cu et du gène *CuMT* lors d'exposition au Cd (Tableau IV-2). La surexpression du gène *CdMT* après exposition au Cu pourrait être due à la présence d'impuretés comme des traces de Cd dans la BB. L'induction des gènes de *MTs* non spécifique pourrait également être la résultante d'effet indirect du Cd ou du Cu sur l'expression génique. En effet, selon Filipič (2012), les métaux peuvent perturber les mécanismes épigénétiques (hyper et hypo méthylations des bases de l'ADN) qui peuvent à leur tour moduler l'expression de certains gènes. Il a d'ailleurs été démontré chez l'embryon de poulet que le Cd joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes en provoquant des méthylations de l'ADN (Doi et al., 2011).

Tableau IV-2 : Synthèse des résultats d'expressions des gènes des métallothionéines obtenus

Une flèche orange montre une augmentation significative de l'expression par rapport au témoin, les flèches rouges montrent une augmentation significative par rapport à l'expression mesurée à 2 mg/L

Exposition	Concentrations réelles		CdMT					CuMT					CdCuMT				
	Contaminant	Date (jours)	0	3,8	8,7	13,1	15 mg/L	0	3,8	8,7	13,1	15 mg/L	0	3,8	8,7	13,1	15 mg/L
24 h	Cd	0 jour	Ctrl	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	Ctrl	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	Ctrl	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	Ctrl	5 mg/L	10 mg/L
			70	↑	1127	↑	2596	↑	4322	91	—	474	—	208	777	11325	—
			6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			12	6365	↑	35103	↑	50684	—	6411	3273	3991	6095	38774	19150	18543	16979
24 h	Cd	6 jours	113	—	2146	↑	3247	↑	1509	940	—	956	—	1363	1286	20419	—
			7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			12	6365	—	34589	—	38747	↑	76518	6411	5025	4476	2360	38774	35585	31639
			12	6365	—	34589	—	38747	↑	76518	6411	5025	4476	2360	38774	35585	31639
24 h	Cd	expo à 6 jrs	1633	↑	10624	↑	50527	↑	103795	146	—	908	↑	1724	6960	4811	—
			20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			1633	↑	10624	↑	50527	↑	103795	146	—	908	↑	1724	6960	4811	—
			20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Continue	Cu (BM)	20	Ctrl	0,5 g/L	1,5 g/L	—	—	Ctrl	0,5 g/L	1,5 g/L	—	—	Ctrl	0,5 g/L	1,5 g/L	—	—
			2002	↑	13149	↑	5676	—	1381	↑	19469	↑	10307	—	9977	↑	37936
			2002	↑	13149	↑	5676	—	1381	↑	19469	↑	10307	—	9977	↑	37936
			2002	↑	13149	↑	5676	—	1381	↑	19469	↑	10307	—	9977	↑	37936

La surexpression de l'isogène *CdCuMT* lors des régimes d'exposition continue au Cd et au Cu est surprenante (Tableau IV-2). Elle pourrait être liée aux propriétés structurales de la protéine *CdCuMT* à la fois proche de la *CdMT* et de la *CuMT*. Cette isoforme mixte serait capable de lier des ions Cd^{2+} ou Cu^+ (Hispard et al., 2008). Cela nous amène à supposer un rôle probable de la *CdCuMT* dans la détoxification du Cd ou du Cu en cas de stress de forte intensité afin de renforcer la *CdMT* ou la *CuMT* lors de la détoxification.

Deuxièmement, cette surexpression pourrait être liée aux effets indirects des métaux sur l'expression des gènes (mécanismes épigénétiques) évoqués dans le paragraphe ci-dessus.

Troisièmement, on peut penser que chacun des isogènes des *MTs* possède un seuil d'activation en cas de stress métallique de forte intensité. Ainsi, en exposition continue, les 3 gènes de *MTs* seraient activés à de fortes concentrations d'exposition pour suppléer les gènes spécifiques (*CdMT* ou *CuMT*) comme l'ont rapporté Ragusa et al. (2012). Ces auteurs suggèrent une réponse hiérarchique des gènes des *MTs* chez les embryons *P. lividus* pour surmonter les stress environnementaux qui peuvent interférer avec un développement normal de l'embryon. Dans le cas des expositions au Cu via la BB, l'induction généralisée pourrait s'expliquer également par la présence de composés non cuivreux du fongicide comme les sulfates (issus du sulfate de Cuivre - CuSO_4) et de la chaux (Ca(OH)_2).

IV.1.4. Facteurs modulant les réponses des embryons aux substances chimiques

IV.1.4.1. Stade de développement embryonnaire

Le régime d'exposition au Cd sur 24 heures a montré l'existence de différences de sensibilité entre les deux stades du développement étudiés, à savoir à J0 au stade 8 cellules-morula et à J6 au stade larvaire. Les EC_{50} basées sur les taux d'éclosion varient du simple ou double pour ces 2 stades : ~5 mg/L pour des embryons exposés en début de stade embryonnaire et ~9,5 mg/L pour des embryons exposés au 6^{ème} jour (Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*). Une toxicité variable de contaminants en fonction de l'âge des embryons a déjà été rapportée par plusieurs auteurs. Hamm et Hinton (2000) ont exposé des embryons de poisson medaka à du diazinon (pesticide) à différents stades de développement. Ils ont démontré que les stades précoces étaient les plus sensibles et que l'absence de granules dans la glande d'éclosion serait causée par ce pesticide. Pennati et al.

(2006) ont montré après des expositions à 2 pesticides (imazalil et triadimefon) que les stades précoces du développement embryonnaire de l'ascidie sont les plus sensibles.

La sensibilité au Cd âge-dépendante des embryons d'escargot chez *H. aspersa* est à mettre en relation avec les résultats obtenus aux niveaux de l'expression des *MTs* et de l'accumulation du Cd dans les œufs (cf III.3.2 et Figure III-24A).

D'après la mesure des concentrations en Cd dans les œufs entiers en régime d'exposition de 24 heures, l'accumulation du Cd chez les 2 stades de développement étudiés est relativement similaire durant la durée de l'expérience (cf III.3, Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*). La principale différence se trouve donc au niveau de l'expression des gènes des *MTs* à 12 jours pour chacun des 2 stades étudiés. En effet, les embryons exposés en début d'embryogenèse ne semblent pas en mesure de surexprimer le gène *CdMT* à 15 mg/L alors que les embryons exposés au début du stade larvaire en sont capables (Tableau IV-2). Cela peut expliquer une partie des différences de sensibilité au Cd de ces 2 stades bien distincts du développement embryonnaire de l'escargot *H. aspersa*. Cependant, afin de valider cette hypothèse, la quantification des *MTs* au niveau protéique est indispensable pour s'assurer que les niveaux d'expressions des gènes sont bien corrélés aux concentrations réelles des protéines. En effet, chez les adultes d'*H. pomatia*, il a été démontré qu'il n'y a pas toujours de relation directe entre ces deux paramètres, le taux de protéine *CdMT* restant élevé durant plusieurs jours après la chute des taux de transcrit du gène *CdMT* (Niederwanger et al., 2014)

IV.1.4.2. Régime d'exposition

Les travaux sur l'embryotoxicité de cette thèse ont été menés sur des œufs exposés au Cd selon 2 modalités d'exposition (continue sur 20 jours et courte sur 24 heures ; Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*). Dans le cas d'une exposition continue, des signes de génotoxicité ont été mis en évidence (apparition et disparition de fragments RAPD) alors que, lors d'expositions de courte durée (24 heures) aucune atteinte au niveau du génome n'a été détectée au cours de l'étude cinétique réalisée. Ces résultats sont quelques peu surprenants, étant donné que les concentrations mesurées dans les œufs lors des deux expériences sont proches (exemple à J6 et J15, en exposition 24 h à 5 mg/L (réel 3,8) et en exposition continue à 4 mg/L (réel 4,7), Figure IV-7). Druart et al. (2010) ont montré qu'après 7 jours d'exposition à 4 et 8 mg/L de Cd en continu, les concentrations mesurées dans l'albumen sont supérieures aux concentrations dans la coque. Ceci laissant supposer, qu'en

exposition continue, après 1 semaine de développement, le Cd pénètre dans l'albumen. Cependant en exposition 24 heures, ces mesures n'ont pas été réalisées dans l'albumen, la localisation précise du Cd dans l'œuf d'*H. aspersa*, lors de ce type d'exposition, reste inconnue.

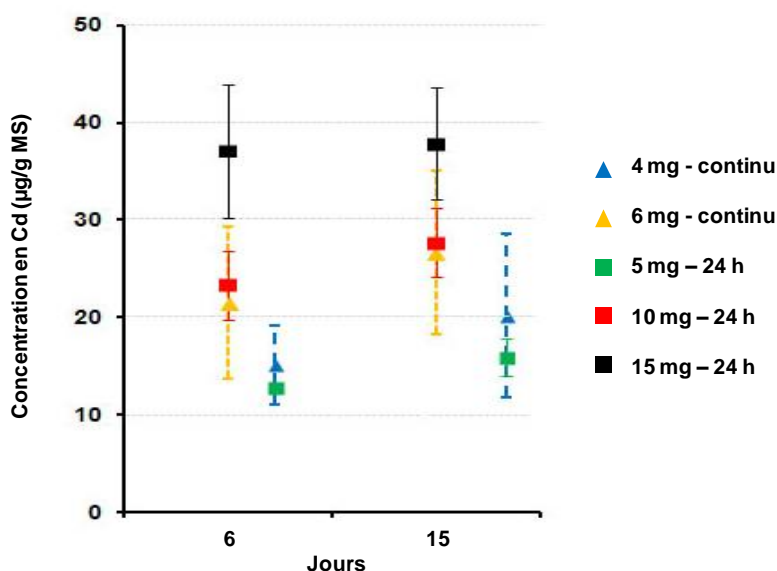


Figure IV-7 : Comparaison des concentrations en Cd mesurées dans les œufs en exposition continue à 4 et 6 mg/L versus 5, 10, 15 mg/L sur 24 h aux jours 6 et 15.

Les résultats obtenus sur l'expression des isogènes de *MTs* (Tableau IV-2) après exposition continue au Cd montrent que le stress engendré lors de ce type de scénario n'est pas le même qu'en exposition courte (24 h). Agnello et al. (2006) ont soumis l'hypothèse que l'apparition de malformations chez l'embryon d'oursin (*Paracentrotus lividus*) était dépendante de 2 facteurs : la concentration en Cd et le temps d'exposition. Cette hypothèse pourrait expliquer les différences d'expression des gènes de *MTs* entre les 2 régimes d'exposition utilisés au cours de cette thèse.

Les résultats contrastés obtenus en RAPD et sur l'expression des gènes de *MTs* montrent l'influence du régime d'exposition des œufs sur les réponses mesurées. Dans notre cas, la RAPD semble plus adaptée pour détecter des signes de génotoxicité chez l'embryon d'escargot lors d'exposition sur la totalité du développement embryonnaire où l'alimentation en Cd est probablement régulière (et donc engendre plus d'effets toxiques) comparée au régime d'exposition de 24 heures. Lors de ce dernier, on peut penser que le Cd est tout d'abord piégé dans la coque et qu'il diffuse ensuite très lentement jusqu'à l'embryon sans possibilité de « ré-alimentation » car après 24 heures l'œuf n'incube plus dans une solution de Cd.

La non-détection d'effet génotoxique après exposition de 24 h, pourrait être expliquée par le rôle de protection joué par la coque calcaire et l'albumen vis-à-vis de l'embryon. Lacoue-Labarthe et al. (2008, 2010) et Bustamante et al. (2002) ont étudié la bioaccumulation de métaux dont le Cd dans les différentes parties de l'œuf de seiche (*Sepia officinalis*). Ils ont ainsi démontré que la coque protège l'embryon du Cd en limitant sa pénétration dans les autres parties de l'œuf. Chez l'escargot *Biomphalaria tenagophila*, il a été démontré que les stades embryonnaires présentaient une sensibilité plus faible à des contaminants organiques par rapport aux stades juvéniles. Cette différence a été attribuée au rôle protecteur de l'albumen (Oliveira-Filho et al., 2005). Le même constat a été effectué chez plusieurs organismes aquatiques (Geffard et al., 2002 ; Lacoue-Labarthe et al., 2009). Lacoue-Labarthe et al. (2008) ont démontré que certains métaux comme l'argent lié à la coque de l'œuf de sèche lors des premiers stades embryonnaires pouvait atteindre l'embryon après l'organogenèse lorsque la coque devient perméable.

IV.2. Conclusion & Perspectives

Cette thèse apporte des nouvelles connaissances quant aux mécanismes mis en jeu dans les réponses des embryons d'escargot terrestre *Helix aspersa* à des contaminants variés (métaux, pesticides). La recherche de signes de toxicité aux niveaux infra-individuels révèle que les cibles affectées diffèrent selon la substance chimique étudiée (Tableau IV-1 : Synthèse des résultats obtenus sur les effets de substances chimiques à différents niveaux chez l'embryon d'escargot *Helix aspersa*).

Nos travaux apportent des données originales sur l'embryotoxicité de contaminant chez l'escargot (perturbation de certains paramètres morphologiques et physiologiques au cours du développement, activation des systèmes de défense, signes de génotoxicité). Les possibilités d'analyses haut-débit offertes par la RAPD-SHR sur ce modèle embryonnaire sont intéressantes dans une perspective d'évaluation du potentiel génotoxique des contaminants.

Si ces travaux ont répondu à certaines interrogations, ils ont également ouvert plusieurs pistes de recherches futures.

- Un suivi de la cinétique d'apparition des premiers effets génotoxiques du Cd en exposition continue serait certainement intéressant pour déterminer si des effets sur le génome sont détectables avant 6 jours. Cela permettrait de statuer quant à la sensibilité de la méthode comparativement à la mesure des paramètres morphologiques au cours du développement embryonnaire étudiés ici.

- Les essais de dissociation cellulaire des embryons (je m'y suis penché durant 2 mois sans résultats concluant) et de caractérisation des types cellulaires doivent être poursuivis afin d'utiliser des tests de génotoxicité type MN ou comète. Ceci dans le but de comparer la sensibilité de ces méthodes d'étude de la génotoxicité avec la RAPD.

- La mesure des concentrations en Cd dans les différents compartiments de l'œuf (albumen, coque) permettrait de statuer sur sa localisation lors d'exposition continue ou sur 24 heures.

- Une étude de la régulation des isogènes des *MTs* durant une exposition au Cu seul semble aussi intéressante afin de comparer les résultats obtenus avec la BB.

- Des recherches sur le gène mixte *CdCuMT* et la protéine associée permettraient de déterminer plus précisément leurs rôles lors de l'embryogenèse d'*H. aspersa*.

- De nouveaux essais en *western blot* doivent être poursuivis (quelques essais ont été réalisés au laboratoire de biochimie de Besançon et à Innsbruck) à partir d'extrait protéiques d'embryons pour permettre une quantification de l'expression des MTs à ce niveau d'organisation biologique. Cela permettrait à terme de confronter les données obtenues sur l'expression des gènes et la synthèse de ces protéines.

- La mise au point d'un système de dosage des ROS (H_2O_2 par exemple) et des activités caspases sur les embryons durant l'exposition continue au Cd semble une bonne perspective afin de déterminer leurs implications potentielles dans les effets toxiques mesurés à d'autres niveaux d'organisation biologique.

Concernant les nouveaux paramètres morphologiques et physiologiques de mesure de l'embryotoxicité proposés dans ce travail, il pourrait être intéressant de réaliser un suivi durant des expositions continues à des pesticides (Corail[®], Round UP[®]) et lors d'exposition de 24 h au Cd. Cela permettrait de montrer si ces critères sont applicables en vue de l'évaluation de la toxicité de contaminants variés.

IV.3. Références bibliographiques

A

- Adam, O., Badot, P.-M., Degiorgi, F., Crini, G., 2009. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 441–449.
- Agnello, M., Filosto, S., Scudiero, R., Rinaldi, A.M., Roccheri, M.C., 2006. Cadmium accumulation induces apoptosis in *P. lividus* embryos. *Caryologia* 59, 403–408.
- Ahmad, M.A., Gaur, R., Gupta, M., 2012. Comparative biochemical and RAPD analysis in two varieties of rice (*Oryza sativa*) under arsenic stress by using various biomarkers. *J. Hazard. Mater.* 217, 141–148.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 125–140.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutat. Res.* 613, 76–102.
- Aydin, S.S., Gokce, E., Buyuk, I., Aras, S., 2012. Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 746, 49–55.

B

- Bandow, C., Weltje, L., 2012. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci. Total Environ.* 435–436, 90–95.
- Ben Salem, Z., Capelli, N., Grisey, E., Baurand, P.-E., Ayadi, H., Aleya, L., 2014. First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 90–96.
- Brulle, F., Morgan, A.J., Cocquerelle, C., Vandenbulcke, F., 2010. Transcriptomic underpinning of toxicant-mediated physiological function alterations in three terrestrial invertebrate taxa: A review. *Environ. Pollut.* 158, 2793–2808.
- Bustamante, P., Teyssi, J., Fowler, S.W., Cotret, O., Danis, B., Miramand, P., Warnau, M., 2002. Biokinetics of zinc and cadmium accumulation and depuration at different stages in the life cycle of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 231, 167–177.

C

- Cenkci, S., Yıldız, M., Cigerci, A., Konuk, M., Bozdog, A., 2009. Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere* 76, 900–906.

D

- Dallinger, R., 1996. Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 113, 125–133.
- Das, S., Khangarot, B.S., 2011. Bioaccumulation of copper and toxic effects on feeding, growth, fecundity and development of pond snail *Lymnaea luteola* L. *J. Hazard. Mater.* 185, 295–305.
- De Wolf, H., Blust, R., Backeljau, T., 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 566, 249–262.
- Doi, T., Puri, P., McCann, A., Bannigan, J., Thompson, J., 2011. Epigenetic effect of cadmium on global de novo DNA hypomethylation in the cadmium-induced ventral body wall defect (VBWD) in the chick model. *Toxicol. Sci.* 120, 475–480.

- Druart, C., Scheifler, R., de Vaufleury, A., 2010. Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails: Screening approach for cadmium and pesticides. *J. Hazard. Mater.* 184, 26–33.
- Druart, C., Scheifler, R., Millet, M., de Vaufleury, A., 2012. Landsnail eggs bioassays: A new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. *Appl. Soil Ecol.* 53, 56–64.
- Durliat, M., Muller, J.-P., Andre, M., Wegnez, M., 1999. Expression of the *Xenopus laevis* metallothionein gene during ontogeny. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 575–578.

E

- El-Maarouf-Bouteau, H., Mazuy, C., Corbineau, F., Bailly, C., 2011. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. *J. Exp. Bot.* 62, 5003–5011.
- Enan, M.R., 2006. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43, 147–154.

F

- Filipič, M., 2012. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 733, 69–77.
- Fourie, F., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 361–368.

G

- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416.
- Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 288–297.
- Gupta, M., Sarin, N.B., 2009. Heavy metal induced DNA changes in aquatic macrophytes: Random amplified polymorphic DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker. *J. Environ. Sci. China* 21, 686–690.

H

- Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74, 205–217.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7–17.
- Hamm, J.T., Hinton, D.E., 2000. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquat. Toxicol.* 48, 403–418.
- Hana, H.Y., Khalil, W.K.B., Elmakawy, A.I., Elmegeed, G.A., 2008. Androgenic profile and genotoxicity evaluation of testosterone propionate and novel synthesized heterocyclic steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110, 284–294.
- Hispard, F., Schuler, D., de Vaufleury, A., Scheifler, R., Badot, P.-M., Dallinger, R., 2008. Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1533–1542.
- Höckner, M., Stefanon, K., de Vaufleury, A., Monteiro, F., Pérez-Rafael, S., Palacios, O., Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Physiological relevance and contribution to metal balance of specific and non-specific Metallothionein isoforms in the garden snail, *Cantareus aspersus*. *Biomaterials* 24, 1079–1092.

K

- Kammenga, J., Laskowski, R. 2000. Demography in Ecotoxicology. John Wiley and Sons. p. 150-153, 297 pp.
- Khangarot, B.S., Das, S., 2010. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. J. Hazard. Mater. 179, 665–675.

L

- Lacoue-Labarthe, T., Bustamante, P., Hörlin, E., Luna-Acosta, A., Bado-Nilles, A., Thomas-Guyon, H., 2009. Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to the Ag and Cu exposure. Fish Shellfish Immunol. 27, 516–521.
- Lacoue-Labarthe, T., Warnau, M., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L., Bustamante, P., 2010. Contrasting accumulation biokinetics and distribution of ²⁴¹Am, Co, Cs, Mn and Zn during the whole development time of the eggs of the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 382, 131–138.
- Lacoue-Labarthe, T., Warnau, M., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L., Koueta, N., Bustamante, P., 2008. Differential bioaccumulation behaviour of Ag and Cd during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Aquat. Toxicol. 86, 437–446.
- Lee, S., Chung, H., Kim, S., Lee, I., 2013. The genotoxic effect of ZnO and CuO nanoparticles on early growth of buckwheat, *Fagopyrum Esculentum*. Water. Air Soil Pollut. 224, 1–11.
- Liu, T., Koene, J.M., Dong, X., Fu, R., 2013. Sensitivity of isolated eggs of pond snails: a new method for toxicity assays and risk assessment. Environ. Monit. Assess. 185, 4183–4190.
- Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Xie, L.J., Han, Y.P., 2009. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. J. Hazard. Mater. 161, 878–883.
- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P., Sun, T., 2007. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. Chemosphere 67, 1155–1163.
- Lord, C.E.N., Gunawardena, A.H.L.A.N., 2012. Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. Eur. J. Cell Biol. 91, 603–613.

M

- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Mar. Pollut. Bull. 64, 2663–2670.
- Mazur, R., Wagner, A., Zhou, M., 2013. The application of the *Lymnaea stagnalis* embryo-test in the toxicity bioindication of surfactants in fresh waters. Ecol. Indic. 30, 190–195.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Garnayak, S.K., Dutta, S.K., 2009. PCR based detection of furadan genotoxicity effects in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. Vet. Res. Commun. 33, 771–780.
- Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. Anal. Bioanal. Chem. 399, 2235–2242.

N

- Niederwanger, M., Pedrini-Martha, V., Höckner, M., Kopp, R., Dallinger, R., 2014. Molecular mechanisms behind snail metal sensitivity: Cadmium metallothionein gene transcription involves activation of metal responsive elements. Oral communication at the SETAC EUROPE 24th Annual Meeting, Basel, Switzerland, 11–15 May 2014.

O

- Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Grisolia, C.K., Paumgarten, F.J.R., 2005. Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 1185–1190.
- Olsson, P.-E., Zafarullah, M., Foster, R., Hamor, T., Gedamu, L., 1990. Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.* 193, 229–235.
- Omar, W.A., Zaghloul, K.H., Abdel-Khalek, A.A., Abo-Hegab, S., 2012. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 746, 7–14.

P

- Pennati, R., Groppelli, S., Zega, G., Biggiogero, M., De Bernardi, F., Sotgia, C., 2006. Toxic effects of two pesticides, Imazalil and Triadimefon, on the early development of the ascidian *Phallusia mammillata* (Chordata, Ascidiacea). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 79, 205–212.

R

- Ragusa, M.A., Costa, S., Gianguzza, M., Roccheri, M.C., Gianguzza, F., 2012. Effects of cadmium exposure on sea urchin development assessed by SSH and RT-qPCR: metallothionein genes and their differential induction. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2157–2167.
- Reape, T.J., McCabe, P.F., 2008. Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* 180, 13–26.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V., 2010. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1530–1536.
- Rocco, L., Izzo, A., Zito, G., Peluso, C., 2011. Genotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to two pharmacological products from an impacted Italian river. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 1, 103.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Zito, G., Archimandritis, A., Peluso, C., Stingo, V., 2012. Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants. *Environ. Toxicol.* 27, 18–25.

S

- Sancho, E., Villarroel, M.J., Fernández, C., Andreu, E., Ferrando, M.D., 2010. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 370–376.
- Schirling, M., Bohlen, A., Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 2006. An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. *Chemosphere* 64, 1730–1738.
- Simoniello, P., Motta, C.M., Scudiero, R., Trinchella, F., Filosa, S., 2011. Cadmium-induced teratogenicity in lizard embryos: Correlation with metallothionein gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 153, 119–127.
- Strmac, M., Oberemm, A., Braunbeck, T., 2002. Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *J. Fish Biol.* 61, 24–38.

Z

- Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 96–103.
- Zhou, J., Cai, Z.-H., Xing, K.-Z., 2011. Potential mechanisms of phthalate ester embryotoxicity in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Environ. Pollut.* 159, 1114–1122.

Valorisation scientifique

Liste des publications relatives à cette thèse acceptées ou soumises

Baurand P.E., Pedrini-Martha V., Niederwanger M., Capelli N., Scheifler R., de Vaufleury A., Dallinger R. **Differential expression of metallothionein isoforms in snail embryos reflects early life stage adaptation to metal stress.** En révision dans PLOS ONE.

Baurand P.E., Capelli N., Scheifler R., de Vaufleury A. **An assessment of the embryotoxicity of cadmium in the terrestrial mollusk *Cantareus aspersus*: From bioaccumulation to impacts at different levels of biological organization.** Ecotoxicology and Environmental Safety 110: 89-94.

Baurand P.E., de Vaufleury A., Scheifler R., Capelli N. 2013. **Coupling of random amplified polymorphic DNA profiles analysis and high resolution capillary electrophoresis system for the assessment of chemical genotoxicity.** Environmental Science & Technology, 47:9505-9513; DOI:10.1021/es4021519.

Liste des autres publications

Ben Salem Z., Capelli N., Grisey E., **Baurand P.E.**, Ayadi H., Aleya L. 2014. **First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 101:90-96.

Afonso E., **Baurand P.E.**, Tournant P., Capelli N. 2014. **First amplification of *Eimeria hessei* DNA from the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) and its phylogenetic relationships with *Eimeria* species from other bats and rodents.** Experimental Parasitology, 139:58-62.

Fritsch C., Coeurdassier M., Faivre B., **Baurand P.E.**, Giraudoux P., van den Brink N., Scheifler R. 2012. **Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: a case study of trace metal transfer to European blackbirds *Turdus merula*.** Science of The Total Environment, 432:275-87.

Liste des participations aux congrès internationaux, nationaux et inter-laboratoire

Baurand P.E., Capelli N., Scheifler R., de Vaufleury A. **Effets du cadmium chez l'embryon d'escargot terrestre *Cantareus aspersus*,** Colloque 2014 de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Besançon, France, 1-2 Juillet 2014.

Baurand P.E., Pedrini-Martha V., Niederwanger M., Capelli N., Scheifler R., de Vaufleury A., Dallinger R. **Expression of metallothionein isoforms in embryos of the terrestrial snail *Cantareus aspersus* reveals early life stage adaptation to metal stress,** SETAC EUROPE 24th Annual Meeting, Basel, Switzerland, 11-15 May 2014.

Baurand P.E., de Vaufleury A., Scheifler R., Capelli N. **The RAPD method: a tool for detecting the genotoxicity of cadmium in terrestrial snail embryos (*Helix aspersa*)**, 3rd SETAC CEE Annual Meeting, Krakow, Poland, 17-19 september 2012.

Baurand P.E., Capelli N. Scheifler R., de Vaufleury A. **Random Amplified Polymorphic DNA et système d'électrophorèse capillaire haute résolution : une nouvelle perspective pour l'évaluation de la génotoxicité des produits chimiques**, Séminaire PCR du laboratoire Chrono-Environnement UMR 6249, 29 Janvier 2013.

Baurand P.E., Dallinger R., Capelli N. Scheifler R., de Vaufleury A. **Identification et expression des métallothionéines chez l'embryon d'escargot terrestre *Helix aspersa***, III^{ème} Journée des doctorants de l'UMR 6249, Besançon, 17 décembre 2013.

Baurand P.E., de Vaufleury A., Scheifler R., Capelli N. **Détection d'effets génotoxiques chez l'embryon d'escargots *Helix aspersa* par technique RAPD**, XVIII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, 6-7 septembre 2012.

Poster

Baurand P.E., de Vaufleury A., Scheifler R., Capelli N. **Amélioration de l'évaluation du potentiel génotoxique de substances chimiques par association de la technique RAPD et d'un système d'électrophorèse capillaire haute résolution**, poster, XIX^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, 13-14 Juin 2013.

Résumé de la thèse

Embryotoxicité de contaminants métalliques et organiques chez l'escargot *Helix aspersa*

Les œufs d'escargot terrestre de l'espèce petit-gris *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus*) peuvent être utilisés pour évaluer l'écotoxicité de substances chimiques pures ou en mélange. La mesure des effets embryotoxiques classiquement réalisée est le succès d'éclosion après 15 à 20 jours d'exposition (Druart et al., 2012). Cependant, les mécanismes impliqués dans la mise en place des effets toxiques à différents niveaux d'organisation biologique chez l'embryon ne sont pas connus. Des œufs d'escargots ont été exposés à des solutions de contaminants métallique (Cd) ou organiques (pesticides: le Round Up® flash, le Corail® et la Bouillie Bordelaise) selon deux modalités différentes (en continu sur la totalité du développement embryonnaire ou sur une période de 24 heures) afin de 1/ déterminer de nouveaux paramètres de mesure au cours du développement embryonnaire pouvant rendre compte d'un effet toxique, 2/ détecter des effets génotoxiques de divers contaminants (solution métallique de Cd ou de formulations commerciales de pesticides) par la méthode *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) et 3/ d'étudier des systèmes de défense métal-spécifiques (métallothionéines).

Les paramètres morphologiques et physiologiques suivis au cours d'expositions continues au Cd ont montré des effets néfastes sur le rythme cardiaque, la durée de l'incubation, la taille et le poids à l'éclosion chez les exposés à la plus forte concentration testée. Chez ces derniers des signes de fragmentation de l'ADN ont également été détectés en fin d'exposition. Le couplage de la méthode RAPD avec un système d'électrophorèse haute résolution (SHR) a permis de détecter des effets génotoxiques suite à des expositions continues au Cd, au Round Up® et au Corail®. L'étude par PCR quantitative de l'expression des gènes des métallothionéines (MTs) a mis en évidence une expression constitutive des MTs ainsi qu'un haut niveau d'expression du gène mixte *CdCuMT* chez les embryons non exposés. Chez les embryons exposés au Cd durant 24 heures, une surexpression du gène spécifique *CdMT* a été mise en évidence alors qu'aucune augmentation significative des taux de transcrits des 2 autres isogènes étudiés (*CuMT* et *CdCuMT*) n'a été démontrée.

Les résultats de toxicité du Cd basés sur le taux d'éclosion et l'expression des gènes des MTs ont démontré que des facteurs comme le régime d'exposition (24 heures ou en continu) ou le stade de développement (âge des embryons lors de l'exposition) peuvent moduler l'embryotoxicité des substances chimiques.

Les données obtenues durant cette étude intégrative permettent de proposer un large panel de paramètres de mesure des effets toxiques des substances chimiques chez l'embryon d'escargot terrestre *H. aspersa* au niveau individuel (rythme cardiaque, taille, durée de développement et succès d'éclosion) et au niveau moléculaire (expression de gènes des systèmes de défense, détection des signes de génotoxicité et de la fragmentation de l'ADN) pour l'évaluation de la toxicité des substances chimiques. L'approche RAPD-SHR, bien que nécessitant une certaine expertise pour l'analyse des profils d'amplifications obtenus, apparaît adaptée pour une détection rapide et efficace du potentiel embryogénotoxiques de substances variées (métaux, pesticides).

Mots clés : escargots, embryotoxicité, métallothionéines, génotoxicité, RAPD-SHR, formulation commerciale de pesticides, cadmium, Bouillie Bordelaise, Round UP®, Corail®

Abstract

Embryotoxicity of metallic and organic chemicals in the land snail

Helix aspersa

The land snail species *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus*) eggs can be used to assess the ecotoxicity of chemicals. Measurement of embryotoxic effect is classically based on hatching success after 15-20 days of exposure (Druart et al., 2012). However, the mechanisms involved in toxic effects in embryos at different levels of biological organization are not known. Eggs of snails were exposed to solutions metallic contaminants (Cd) or organic (pesticides: Round Up® Flash, Corail® and Bordeaux Mixture) in two different regimes (continuous over the entire embryonic development or during a period of 24 hours), in order to 1 / identify of new endpoints of toxic effect measurements during embryonic development, 2 / detect of genotoxic effects of metal solution (Cd) or three pesticides commercial formulations by *Random Amplified Polymorphic DNA* method (RAPD) and 3 / study metal-specific defense systems (metallothionein).

Morphological and physiological parameters monitored during Cd continuous exposures showed adverse effects on heart rate, duration of incubation, size and weight of new hatchlings exposed to the highest concentration tested. In the latter, signs of DNA fragmentation were detected at the end of exposure. Coupling the RAPD with a high-resolution electrophoresis system (SHR) has enabled to detect genotoxic effects of Cd, Round Up® and Corail® after continuous exposures. Quantitative PCR study of metallothioneins (MTs) gene expression has showed constitutive expression of *MTs* genes and a high level of mRNA for the mixed gene *CdCuMT* in unexposed embryos. In embryos exposed to Cd for 24 hours, an overexpression of the specific gene *CdMT* has been demonstrated whereas the two other isogenes (*CuMT* and *CdCuMT*) didn't show significant induction of expression rates.

The toxicity results based on the hatching rate and *MTs* genes expression obtained with Cd have showed that factors such as the exposure regime (24 hours or continuous) or the stage of development (age of embryos upon exposure) can modulate embryotoxicity of chemicals. This thesis provides a wide range of endpoints usable at the individual level (heart rate, height, hatching monitoring) and at the molecular level (gene expression of defense systems, detection of genotoxicity signs and *DNA laddering*) for the assessment of the ecotoxicity of chemical substances. The RAPD-SHR, although requiring some expertise to analyze profiles obtained, appears suitable for rapid and efficient detection of potential embryogenotoxic effects of various substances (metals, pesticides).

Keywords: snails, embryotoxicity, metallothionein, genotoxicity, RAPD-HRS, commercial formulation of pesticides, cadmium, Bordeaux Mixture, Round UP®, Corail®